Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
von Hormon- und Stoffwechselstörungen
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON SEXUALHORMONBINDENDEM GLOBULIN AUS KANINCHENSERUM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
SIGRID HEROLD
aus Dernbach

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523702_0075

Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
von Hormon- und Stoffwechselstörungen
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON SEXUALHORMONBINDENDEM GLOBULIN AUS KANINCHENSERUM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
SIGRID HEROLD
aus Dernbach

1978

Dekan: Professor Dr. H.-E. Hoffmeister

Berichterstatter: Professor Dr. D. Gupta

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

SOFORTDRUCK H. G. VOGLER TÜBINGEN

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Methoden	
2.1.	Test zur Bestimmung der DHT-Bindungs-aktivität	7
2.1.1.	Theoretische Vorbemerkungen	7
2.1.2.	Praktische Durchführung des Tests	8
2.2.	Quantitative Bestimmung des SHBG	9
2.2.1.	Theoretische Vorbemerkungen	9
2.2.2.	Praktische Durchführung des Tests	10
2.3.	Radioaktivitätsmessung mit dem Flüssig-keitsszintillations-Zähler	11
2.4.	Konzentration und Dialyse	12
2.5.	Ionenaustauschchromatographie	13
2.5.1.	Theoretische Vorbemerkungen	13
2.5.2.	Praktische Durchführung	13
2.6.	Gelchromatographie	15
2.6.1.	Theoretische Vorbemerkungen	15
2.6.2.	Praktische Durchführung der Gelchroma-tographie	17
2.6.2.1.	Durchführung der präparativen Gelchro-matographie	17
2.6.2.2.	Durchführung der analytischen Gelchro-matographie	17
2.7.	Affinitätschromatographie	19
2.7.1.	Theoretische Vorbemerkungen	19
2.7.2.	Praktische Durchführung der Affinitäts-chromatographie auf Con A-Sepharose	19
2.8.	Isoelektrische Fokussierung	20
2.8.1.	Theoretische Vorbemerkungen	20
2.8.2.	Praktische Durchführung der isoelektri-schen Fokussierung in granulierten Gelen	21

Seite

2.8.2.1. Durchführung der analytischen isoelektrischen Fokussierung 22

2.8.2.2. Durchführung der präparativen isoelektrischen Fokussierung 23

2.9. Analytische Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgel 24

2.9.1. Theoretische Vorbemerkungen 24

2.9.2. Praktische Durchführung 25

3. Verlauf und Ergebnisse der Arbeit

3.1. Ausgangsmaterial 29

3.2. Trennprozedur 29

3.3. Fraktionierung von 36 ml Kaninchenserum 30

3.3.1. Ammonsulfatfällung der Globuline 30

3.3.2. Überprüfung der Salzfällung durch Gelfiltration auf Sephadex S-200 30

3.3.3. Auftrennung des Dialysats der Ammonsulfatfällung auf DEAE-Sephadex A 50 30

3.3.4. Tabelle: Übersicht über die bisherige Fraktionierung 33

3.3.5. Zusammenfassung und Diskussion der bisherigen Ergebnisse 33

3.4. Fraktionierung von 257 ml Kaninchenserum 34

3.4.1. Ammonsulfatfällung der Globuline 34

3.4.2. Auftrennung des Dialysats der Ammonsulfatfällung auf DEAE-Sephadex A 50 34

3.4.3. Rechromatographie des Pools A1 (Fraktion 143-174)auf DEAE-Sephadex A 50 35

3.4.4. Chromatographie des Pools A2k (Fraktion 129-159) auf Sephadex S-200 sf 35

3.4.5. Rechromatographie von Pool A3k (Fraktion 28-36) auf Sephadex S-200 sf 37

Seite

3.4.6. Übersicht über die Trennprozedur 37
3.4.7. Diskussion der bisherigen Ergebnisse 40
3.4.8. Chromatographie von Pool A2k auf Con A-Sepharose 41
3.4.9. Chromatographie von Pool A3bk auf Sephadex S-200 42
3.4.10. Chromatographie von Pool A4b auf Con A-Sepharose 42
3.4.11. Diskussion der bisherigen Ergebnisse 42
3.5. Bestimmung von Molekulargewicht und Stokes-Radius von Kaninchen-SHBG 45
3.6. Fraktionierung von 264 ml Kaninchenserum 47
3.6.1. Vorfraktionierung 47
3.6.2. Analytische isoelektrische Fokussierung von Pool B2 47
3.6.3. Präparative isoelektrische Fokussierung von Pool B2k 48
3.6.4. Chromatographie von Pool B3 auf Con A-Sepharose 48
3.6.5. Übersicht über die Fraktionierung 49
3.6.6. Zusammenfassung und Diskussion der bisherigen Ergebnisse 49
3.7. Bestimmung der SHBG-Konzentrationen in den Seren männlicher und weiblicher Kaninchen 53

4. Diskussion
4.1. Versuche zur Isolierung von Kaninchen-SHBG 54
4.2. Physikalisch-chemische Eigenschaften von Kaninchen-SHBG 58
4.3. Quantitative SHBG-Bestimmungen bei männlichen und weiblichen Kaninchen 60

Seite

5. Zusammenfassung 61

6. Literaturverzeichnis 62

1. Einleitung

Die Erforschung der Proteinbindung von Sexualsteroiden begann mit Untersuchungen von EIK-NES et al. (1954), WESTPHAL et al. (1962) und ALFSEN (1963) zur Bindung von Testosteron an Albumin. MERCIER et al. (1966) gelang Mitte der sechziger Jahre der Nachweis eines testosteronbindenden Plasmaproteins, das mittels Chromatographie auf DEAE-Cellulose von dem ebenfalls testosteronbindenden Albumin und Transcortin abtrennbar ist. Man fand später (MURPHY 1968), daß es mit einem zur gleichen Zeit von ROSENBAUM et al. (1966) entdeckten östradiolbindenden Globulin identisch war. Je nach Autor wurde es dann Testosteron-bindendes Globulin (TeBG), Sexualhormon-bindendes Globulin bzw. Protein (SHBG, SHBP) oder auch Sex Steroid binding Globulin (SSBP) genannt.

Quantitative SHBG-Bestimmungen in menschlichen Seren ergaben folgende Ergebnisse: Kinder haben höhere SHBG-Konzentrationen als Erwachsene, die SHBG-Konzentration von erwachsenen Frauen ist mit ca. 4 mg/l ungefähr doppelt so hoch wie die von Männern mit durchschnittlich 1,9 mg/l (ANDERSON 1974, BLANK et al. 1978, ATTANASIO et al.) und steigt in der Schwangerschaft auf das 5 - 10fache an (VERMEULEN et al. 1968, CORVOL et al. 1971). Es besteht ein Konzentrationsgefälle zwischen mütterlichem und fetalem SHBG; bei der Mutter beträgt die SHBG-Konzentration ungefähr das 2ofache der SHBG-Konzentration des Feten (ANDERSON et al. 1976). Beim Neugeborenen steigt die SHBG-Konzentration in den ersten Lebenstagen an, zu dieser Zeit bestehen keine größeren Geschlechtsunterschiede (VERMEULEN et al. 1969, TULCHINSKY et al. 1973, ATTANASIO et al. 1977). Im Laufe der Pubertät sinkt die SHBG-Konzentration bei Knaben stärker als bei Mädchen auf die Erwachsenenwerte ab (BLANK et al. 1978, ATTANASIO et al.). Erhöhte SHBG-Konzentrationen finden sich z.B. bei Hyperthyreose oder Männern mit chronischen Lebererkrankungen, erniedrigte SHBG-Konzen-

trationen bei idiopathischen Hirsutismus, Hypothyreose und Akromegalie (GALVAO-TERES et al. 1973, OLIVO et al. 197o, ROSENFIELD 1971, DE MOOR et al. 1972).
Die Betrachtung der physiologischen SHBG-Konzentrationen in Zusammenhang mit der Konzentration der Sexualhormone und der Änderung der SHBG-Konzentration bei verschiedenen Krankheitsbildern führte ANDERSON (1974) zu der These, dem SHBG die Rolle eines "servo-amplifiers" für Sexualhormone zuzuschreiben: Östrogene setzen die SHBG-Aktivität herauf, es wird vermehrt Testosteron gebunden und somit mehr Östrogenwirkung erzielt, als es dem ursprünglichen Östrogenanstieg entspricht. Testosteron und andere Androgene erniedrigen die SHBG-Aktivität, dadurch wird noch zusätzliches Androgen freigesetzt, sodaß auch hier eine Wirkungsverstärkung eintritt.

Andere Arbeiten beschäftigten sich mit den physikalisch-chemischen Eigenschaften des SHBG und dem Problem seiner Isolierung.
(Human-)SHBG ist ein Glykoprotein (VAN BAELEN et al. 1969), das in der Elektrophorese mit den ß-Globulinen wandert (MERCIER 1966). Es hat mehrere isoelektrische Punkte zwischen 5,2 und 5,5 (HANSSON et al. 1972). Das Molekulargewicht wurde von den meisten Untersuchern auf Werte zwischen 95000 und 115000 geschätzt (VAN BAELEN et al. 1968, ROSNER et al. 1969, CORVOL et al. 1971, HANSSON et al. 1972, BLANK 1975); MERCIER-BODARD et al. (197o), die aus gereinigtem SHBG ein MG von 52000 erhielten, hatten vermutlich Fragmente isoliert. Der Stokes-Radius des SHBG beträgt ungefähr 46 Å (HANSSON et al. 1972, BLANK 1975). Die Assoziationskonstante für Testosteron beträgt bei 37°C ungefähr 10^9 M^{-1}; die Affinität des SHBG zu 5-alpha-Dihydrotestosteron (DHT) beträgt etwa das Dreifache, die zu Östradiol ungefähr ein Drittel der Affinität zu Testosteron (ANDERSON 1974). Für die Bindung der Steroide ist eine 17-beta-Hydroxylgruppe und ein ebener A-Ring unabdingbar (VERMEULEN

et al. 1968, ANDERSON 1974); Corticosteroide werden daher nicht gebunden.
Die Isolierung des SHBG erwies sich als recht problematisch, einmal wegen der von vornherein sehr geringen Serumkonzentrationen, zum anderen führten sämtliche Trennprozeduren zu einem weitgehendem Aktivitätsverlust des SHBG. MERCIER-BODARD et al. (1971) isolierten aus Cohn-Fraktion IV über Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration ein hochgereinigtes, jedoch wenig bindungsaktives Protein, dessen MG zu 52000 bestimmt wurde. BOHN (1974) beschreibt die Isolierung des SHBG aus Placenten in acht Schritten, darunter zweimal präparative Zonenelektrophorese. Er erhält zwar eine große Menge diskelektrophoretisch einheitlichen Materials, macht aber keine Aussage über dessen Bindungsaktivität. BLANK (1975) isoliert aus Cohn-Fraktion IV mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration 3,5 mg eines diskelektrophoretisch einheitlichen, jedoch zu 98 % ebenfalls nicht mehr bindungsaktiven Proteins. Schließlich beschreibt ROSNER (1975) die Isolierung des SHBG aus Cohn-Fraktion IV mittels Affinitätschromatographie, Gelfiltration und isoelektrischer Fokussierung. Er findet zudem, daß zur Erhaltung der Aktivität des SHBG Kalziumionen unbedingt vonnöten sind; dies mag die starken Aktivitätsverluste der vorhergehenden Präparationen erklären.

Untersuchungen des SHBG verschiedener Tierarten zeigten folgendes: Dem menschlichen SHBG am ähnlichsten scheint naturgemäß das SHBG anderer Primaten zu sein. So fanden GAUTHIER-WRIGHT et al. (1973) bei Makakenaffen ein SHBG mit einem MG von 105000 und einem isoelektrischen Punkt von 5,11, was gut mit den entsprechenden Werten beim Human-SHBG übereinstimmt. MAC CORMACK (1971) untersuchte die Testosteronbindung von Schimpansen in verschiedenen Altersstufen und fand ähnliche altersabhängige Änderungen, wie sie beim Menschen vorliegen. Bei Ratten findet sich SHBG nur bei schwangeren Ratten, im

Fetus und bei ganz jungen Ratten, aus deren Serum es innerhalb der ersten vier Lebenswochen ganz verschwindet. Möglicherweise ist hier das Schwangeren-SHBG fetalen Ursprungs. Ratten-SHBG bindet zudem nur Östradiol, kein Testosteron (RAYNAUD et al. 1971). Es sieht also so aus, daß das SHBG nicht unbedingt lebensnotwendig ist; auch die "servo-amplifier"-Theorie von ANDERSON (1974) trifft hier nicht mehr zu. Auch beim Meerschweinchen scheint im Serum nicht-schwangerer erwachsener Tiere kein SHBG vorzuliegen. LEA (1973) isolierte SHBG aus dem Serum schwangerer Tiere mittels Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration und präparativer Polyacrylamidgelelektrophorese. Er fand bei dem isolierten Protein ein MG ein 82800, einen Stokes-Radius von 49 Å, zwei isoelektrische Punkte (4,4 und 3,5); die Assoziationskonstante für Progesteron bei 4°C betrug $1,4 \times 10^9\ M^{-1}$, für Testosteron $8,2 \times 10^7\ M^{-1}$.

Beim Kaninchen findet sich SHBG bei allen Tieren, nicht nur in der Schwangerschaft. MAHOUDEAU et al. (1973) schätzten das MG aus unfraktioniertem Serum mittels Gelfiltration und Polyacrylamidgelelektrophorese auf 74000, die Affinitätskonstante für Testosteron betrug bei 4°C $6,16 \times 10^8\ M^{-1}$. ROSNER et al. (1973) finden für Dihydrotestosteron eine Affinitätskonstante von $1,1 \times 10^9\ M^{-1}$; es wird zudem gezeigt, daß das SHBG mittels Gelfiltration, Polyacrylamidgelelektrophorese und Ammonsulfatfällung vom Corticosteroid-bindenden Globulin abtrennbar und somit unterscheidbar ist. Kaninchen-SHBG bindet im Gegensatz zu Human-SHBG kaum Östrogene, die Affinitätskonstanten für Testosteron und Dihydrotestosteron stimmen jedoch ganz gut mit denen des menschlichen SHBG überein. Von den gängigen Labortieren (zu denen Affen sicher nicht gehören) scheint daher aufgrund der Bindungscharakteristik und der Tatsache, daß SHBG bei Ratten und Meerschweinchen im wesentlichen in der Schwangerschaft vorkommt, lediglich das Kaninchen als Modell für weite-

re Untersuchungen des SHBG-Stoffwechsels geeignet.

Tabelle: Übersicht über die Assoziationskonstanten des SHBG für Testosteron, Dihydrotestosteron und Progestoron bei verschiedenen Arten (soweit bekannt)

	Assoziationskonstante für		
	Testosteron	Dihydro-testosteron	Progesteron
Human-SHBG	ca. 10^9 M^{-1} (BURKE et al. 1972)	ca. 3 x 10^9 M^{-1} (ANDERSON 1974)	
Ratten-SHBG	Testosteron und Dihydrotestosteron werden nicht gebunden (RAYNAUD 1971)		
Meerschw.-SHBG	8,2 x $10^7 M^{-1}$ (LEA 1973)		1,4 x 10^9 M^{-1} (LEA 1973)
Kaninchen-SHBG	6,16 x 10^8 M^{-1} (MAHOUDEAU et al. 1973)	1,4 x 10^9 M^{-1} (ROSNER et al. 1973)	

Dem Laboratorium, in dem die vorliegende Arbeit entstand, entstammen zahlreiche Arbeiten, die sich mit der Plasmakonzentration und der Urinausscheidung verschiedener Sexualhormone während des Wachstums und insbesondere während der Pubertät befassen (GUPTA et al. 1975 - weitere Zitate dort -). Da nun das Stoffwechselverhalten und die biologische Wirksamkeit der Hormone in hohem Maße von ihrer Proteinbindung abhängen, fand in diesem Zusammenhang das SHBG zunehmendes Interesse. BLANK (1975) fand eine relativ einfache Methode zur Isolierung von Human-SHBG (zweimal Ionenaustauschchromatographie + zweimal Gelfiltration) und entwickelte einen einfachen Test zur direkten quantitativen SHBG-Bestimmung. Andere Arbeiten beschäftigten sich mit der SHBG-Konzentration von Jungen und Mädchen in verschiedenen Pubertätsstadien

(BLANK et al. 1976, ATTANASIO et al.).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun:

1. zu versuchen, die von BLANK (1975) in unserem Labor entwickelte Methode zur Isolierung von menschlichem SHBG auf Kaninchen-SHBG zu übertragen mit der - über diese Arbeit hinausgehenden - Absicht, mit markiertem Protein Stoffwechseluntersuchungen anstellen zu können,
2. die SHBG-Konzentrationen bei männlichen und weiblichen Kaninchen vergleichend zu bestimmen.

2. Methoden

2. 1. Test zur Bestimmung der DHT-Bindungsaktivität

2.1.1. Theoretische Vorbemerkungen

Zum Zwecke des Fraktionen-Screening ist es wichtig, über einen Test zu verfügen, der die schnelle Untersuchung zahlreicher Proben bei genügend hoher Spezifität erlaubt. Aufgrund der hohen Affinität des SHBG zu Dihydrotestosteron (Assoziationskonstante des Kaninchen-SHBG für Dihydrotestosteron ca. $1{,}4 \times 10^{9}\ M^{-1}$ (ROSNER et al. 1973)) und der großen Spezifität dieser Bindung, bietet sich eine Markierung mit ^{3}H-DHT an.

Dazu wird die Probe bei 37°C zur schnelleren Einstellung des Gleichgewichts mit ^{3}H-DHT inkubiert. Ungebundenes Steroid wird anschließend in der Kälte (Verlangsamung der Dissoziation des SHBG-DHT-Komplexes) mit dextranbeschichteter Aktivkohle entfernt (MURPHY 1968). Nach 15 Minuten ist nur noch spezifisch gebundenes Steroid in der Lösung vorhanden (BAULIEU et al. 1970). Die Aktivkohle wird durch Zentrifugieren entfernt und die Aktivität in einem Aliquot des Überstandes gemessen. Das Verhältnis Steroid gebunden/Steroid total - in Prozent ausgedrückt - wird im folgenden als Steroidbindungsaktivität bezeichnet und stellt ein allerdings nicht lineares Maß für die SHBG-Konzentration in der Probe dar. Unter standardisierten Bedingungen sind die Werte gut reproduzierbar. Die Tatsache, daß Albumin ebenfalls unspezifisch DHT bindet, kann vernachlässigt werden, da die DHT-Bindungsaktivität auch bei Konzentrationen von 20 mg/ml nie über 35 % steigt, die aktuelle Albuminkonzentration in den Proben jedoch mindestens eine Zehnerpotenz geringer ist.

2.1.2. Praktische Durchführung des Tests

Materialien:

^{3}H-Dihydrotestosteron, SA 2o uCi/mMol (Fa. NEN)
radioaktive Konzentration 0,25 uCi/ml in Äthanol

Pufferlösung: Sörensens physiologischer Phosphatpuffer
0,15 m Na_2HPO_4 x 2 H_2O / KH_2PO_4; pH 7,4
1,74 g Kaliumdihydrogenphosphat
9,6 g Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H_2O
aqua deion. ad 1 l

Dextrankohle-Suspension: 200 mg Norit A (Fa. Serva)
200 mg Dextran T 500 (Fa. Serva)
Sörensen-Puffer ad 100 ml

Geräte: Stock-Zentrifuge
Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer Tricarb 2002 (Fa. Packard)

Arbeitsvorschrift.

Je 5o ul DHT-Arbeitslösung werden in Plastikreagenzröhrchen 65 x 110 mm pipettiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nun werden 0,1 ml Probe und 0,9 ml Puffer zupipettiert, 30 Sekunden geschüttelt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wird der Ansatz 5 Minuten bei - 40°C im Tiefkühlfach gehalten, die anschließenden Arbeiten werden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt: Aus jedem Röhrchen werden 50 ul zur Bestimmung der Totalaktivität (cpm_1) in ein Zählgläschen mit 10 ml Toluolszintillator gegeben. Anschließend wird 100 ul Dextrankohle-Suspension zu jedem Ansatz gegeben, geschüttelt und 15 Minuten stehengelassen; danach wird die Dextrankohle 15 Minuten bei 800g abzentrifugiert und dem Überstand je 200 ul zur Bestimmung des gebundenen DHT entnommen (cpm_2). Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\text{DHT-BA} = \frac{cpm_2}{cpm_1} \times 0{,}263 \times 100\ \%$$

2.2. Quantitative Bestimmung des SHBG

2.2.1. Theoretische Vorbemerkungen

Um die Reinigung des SHBG in den einzelnen Trennschritten verfolgen zu können, ist es nötig, über die DHT-Bindungsaktivität hinaus die SHBG-Menge quantitativ bestimmen zu können. Hierzu wird der von BLANK (1975) entwickelte Test benutzt. Dieser geht aus von dem Ammonsulfatfällungstest, wie er von ROSNER (1972) zur Bestimmung des SHBG im Serum beschrieben wurde: Nach Sättigung der Probe mit DHT wird die Globulinfraktion mit Ammonsulfat ausgefällt, freies und albumingebundenes DHT bleiben in Lösung. Die globulingebundene DHT-Menge wird aus der Differenz Totalaktivität minus Aktivität im Überstand ermittelt, nachdem die Globuline abzentrifugiert sind. Diese Berechnung aus der Differenz ist deshalb nicht günstig, weil vom mathematisch-statistischen Standpunkt aus die Differenz Totalaktivität minus Aktivität im Überstand zwischen 80 und 20 % der Totalaktivität liegen sollte, was der Erfordernis, einen möglichst hohen Steroidüberschuß anzuwenden, entgegensteht. Weitere Komplikationen stellten sich dar in der Tatsache, daß in albuminarmen Proben nach Zugabe der Ammonsulfatlösung bis zu 50 % der Aktivität an die Wand der Proberöhrchen absorbiert wurde, sodaß man eine hohe Pseudobindung erhält, und in dem Umstand, daß sehr geringe Globulinmengen nicht quantitativ ausgefällt und abzentrifugiert werden konnten.

Diese Störungen wurden von BLANK (1975) ausgeschaltet durch die Verwendung eines Puffers, der Rinder-Serumalbumin und Rinder-gamma-Globulin enthält. Außerdem wurde die Zentrifugation durch Absaugen der ausgefällten Globuline über ein Membranfilter ersetzt. Diese lassen sich im Toluolszintillator direkt auszählen, sodaß der gebundene DHT-Anteil direkt meßbar wird; zugleich können weit höhere Steroidüberschüsse angewandt werden.

2.2.2. Praktische Durchführung des Tests

Materialien:

^{3}H-Dihydrotestosteron, SA 20 uCi/mMol (Fa. NEN)
radioaktive Konzentration 5 uCi/ml in Athanol

Pufferlösungen: Sörensens physiologischer Phosphatpuffer (0,15 M; pH 7,4) mit Zusatz von
1 mg/ml Rinder-Serumalbumin (Fa. Behring) oder Kaninchen-Albumin (Fa. SIGMA) und
2 mg/ml Rinder-gamma-Globulin (Fa. SIGMA)
dergleiche Puffer, jedoch proteinfrei
Dextrankohle-Suspension, wie unter 2.1.2. beschrieben

Geräte:

Membranfilter-Unterdruckabsauggerät, dazu Membranfilter 25 mm Ø Nr. 11306 (Fa. Sartorius)

Arbeitsvorschrift:

Aus Proben, die wie Serum endogenes Steroid enthalten, wird dieses durch Behandeln mit Aktivkohle entfernt: Zu 0,1 ml der Probe wird 0,8 ml proteinfreier Puffer und 0,1 ml Dextrankohle-Suspension gegeben (= 10fache Verdünnung der Probe), die Mischung wird über Nacht geschüttelt.

In Plastikröhrchen (65 x 13 mm) wird 0,1 ml Tracerlösung pipettiert, das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Anschließend wird in jedes Röhrchen 0,1 ml der verdünnten Probe, aus der die Dextrankohle zuvor abzentrifugiert wurde, und 0,4 ml proteinhaltiger Puffer gegeben. Dieser Ansatz wird 30 Sekunden geschüttelt, eine Stunde bei 37°C inkubiert, dann 5 Minuten bei - 40°C im Tiefkühlfach gehalten. Die anschließenden Arbeitsgänge werden bei 4°C im Kühlraum ausgeführt: Jedes Röhrchen wird mit 0,5 ml kalter gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt und 5 Minuten zur Ausbildung eines grobdispersen Niederschlags stehengelassen. Anschließend wird geschüttelt und ein Aliquot von 0,2 ml über ein Membranfilter, das zuvor mit 1 ml halbgesättigter Ammonsulfatlösung benetzt wurde, abgesaugt; es wird mit ei-

nem weiteren ml halbgesättigter Ammonsulfatlösung nachgewaschen. Der Filter wird direkt in 10 ml Toluolszintillator gegeben und nach 12stündigem Stehenlassen ausgezählt. Bei jedem Test wird ein Leerwert mitgeführt, der aus 0,5 ml proteinhaltigem Puffer besteht. Um unter einen Variationskoeffizienten von 5 % zu kommen, sind in der Regel Dreifachbestimmungen erforderlich.

Berechnung des Ergebnisses:
Unter der Voraussetzung, daß das SHBG mit DHT abgesättigt ist und daß Kaninchen-SHBG wie Human-SHBG eine Bindungsstelle pro Molekül besitzt (Nachweis bei z. B. MERCIER-BODARD et al. 197o), ergibt sich seine Konzentration in der untersuchten Probe nach folgender Formel:

$$\text{SHBG (mg/l)} = \frac{cpm_5 \text{ (Probe - Leerwert)} \times MG \times 10 \times f_V}{eff \times SA}$$

Es bedeuten:

cpm_5 = counts in 5 Minuten
MG = Molekulargewicht des SHBG in mg
f_V = Verdünnung der Probe
10 = Umrechnungsfaktor auf ein ml
eff = "effiency" der Szintillationsmessung
SA = spezifische Aktivität des Tracers in dpm/Mol

2.3. Radioaktivitätsmessung mit dem Flüssigkeitsszintillations-Zähler

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Dihydrotestosteron ist Tritium-markiert; zur Radioaktivitätsmessung wurde ein Flüssigkeitsszintillations-Zähler Modell Tricarb 2002 der Fa. Packard verwendet. Auf die theoretischen Grundlagen dieser Technik soll hier nicht weiter eingegangen werden.
Da die lipophilen Steroide von Toluol aus wässrigen Lösungen herausextrahiert werden, selbst wenn sie in Komplexen mit Proteinen vorliegen, konnte eine der gebräuchlichen Szintillations-

mischungen auf Toluol/PPO/DMPOPOP-Basis verwandt werden. Pro Zählgläschen mit 10 ml Szintillationsmischung wurden bis zu 0,2 ml wässrige Phase gegeben. Die erhaltene Suspension wurde kräftig geschüttelt und zur Extraktion der Steroide mindestens 2 Stunden stehengelassen. Intern standardisiert wurde mit ^{3}H-Toluol, die effiency des Zählers lag bei der unten angegebenen Einstellung bei 36 %.

Einstellung des Tritiumfensters bei allen Messungen:

window 0,5 - 10

gain 5

Zusammensetzung der Szintillatormischung:

5 g PPO

0,1 g DMPOPOP

Toluol p.A. ad 1 l

2.4. Konzentration und Dialyse

Alle Konzentrationsschritte wurden mittels osmotischem Wasserentzug durchgeführt.

Materialien:

Visking Dialysierschlauch 16 mm Breite (Fa. Serva)

Polyvinylpyrrolidon MG 40000 (Fa. Fluka

Polyäthylenglykol MG 20000 (Fa. Serva)

Polyvinylpyrrolidon wurde in 40 %iger Lösung benutzt, Polyäthylenglykol in 20 %iger Lösung.

Mit beiden Medien wurde in 6 Stunden eine Konzentration um etwa den Faktor 3 erreicht.

Diese Methode ist sehr schonend; außerdem kann gleichzeitig ein Wechsel des Puffermilieus erfolgen, indem das Polyvinylpyrrolidon bzw. das Polyäthylenglykol in dem neuen Puffer gelöst werden.

Dialyse ohne Konzentration wurde ebenfalls mit Visking-Dialysierschläuchen vorgenommen. Das Verhältnis von Außenvolumen zu Innenvolumen lag bei etwa 30 : 1; die Außenlösung wurde zwei- bis dreimal in 12 Stunden gewechselt. Die Angleichung

von Außen- und Innenmedium wurde durch Chlorid- bzw. pH-Bestimmungen überprüft.

2.5. Ionenaustauschchromatographie

2.5.1. Theoretische Vorbemerkungen

Die Ionenaustauschchromatographie beruht auf der reversiblen Adsorption und der anschließenden, durch kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Wechsel des Puffermilieus hervorgerufenen, fraktionierten Desorption von Proteinen unterschiedlicher Oberflächenladungen. Das Startmilieu wird so gewählt, daß das oder die zu trennenden Proteine zunächst adsorbiert werden; die wirksamen Kräfte sind dabei Coulomb-Kräfte zwischen den Oberflächenladungen des Proteins und den funktionellen Gruppen des Austauschers. Ihre Stärke hängt somit vom Ionisatiosgrad der Proteine und des Austauschers ab, der seinerseits von pH und Ionenstärke des Puffers beeinflußt wird. pH und Ionenstärke sind somit die Parameter, über die Adsorption und Desorption der Proteine gesteuert werden. Die Auswahl des Austauschers, die als Kationen- wie auch als Anionenaustauscher in verschiedener Stärke erhältlich sind, richtet sich nach dem isoelektrischen Punkt des abzutrennenden Proteins (am I.P. ist die Bindung am schwächsten) und nach dessen Stabilitätsbereich.

Bei dem vorliegenden Trennproblem waren folgende Eigenschaften wünschenswert:

1) Hohe Bindungskapazität
2) Kaninchen-SHBG mit einem I.P., der wie bei Human-SHBG vermutlich im Sauren liegt, soll bei pH 7,4 und mäßiger Ionenstärke adsorbiert werden.

Diese Kriterien werden von dem schwach basischen Ionenaustauscher DEAE-Sephadex A 50 erfüllt.

2.5.2. Praktische Durchführung

Materialien:

Startpuffer: 0,05 M Tris-HCl pH 7,4; 0,005 M $CaCl_2$; 0,07 M NaCl; 0,002 % Chlorhexidin

6,02 g Tris
0,74 g $CaCl_2$ x 2 H_2O
4,1 g NaCl
2 ml Chlorhexidin 1 %ig in H_2O
mit HCl eingestellt auf pH 7,4
aqua deion. ad 1 l

Endpuffer: wie Startpuffer, NaCl-Konzentration jedoch 0,17 M (9,93 g/l)

DEAE-Sephadex A 50 (Fa. Pharmacia)

Geräte: Fraktionssammler Ultrorac (Fa. LKB)
UV-Durchflußfotometer Uvicord (Fa. LKB)
Gradientenmixer GM 200 (Fa. Pharmacia)
Chromatographiesäulen K 26/40, K 50/40 mit Adapter (Fa. Pharmacia)
Spektralphotometer PMQ II (Fa. Zeiss)

Der Umgang mit DEAE-Sephadex erfolgte gemäß der Firmenschrift "Sephadex Ionenaustauscher; Leitfaden zur Ionenaustauschchromatographie" der Fa. Pharmacia. Die notwendige Gelmenge wurde nach folgender Faustregel ermittelt:

$$\text{DEAE-Sephadex (g)} = \frac{\text{Proteinmenge (g)}}{\text{Hb-Kapazität}} \times 10$$

Als "Proteinmenge" wurde zur Sicherheit alles in der Probe vorhandene Protein eingesetzt. Die so abgeschätzte Menge trockenen Austauschers wurde in Startpuffer eingerührt, 6 Stunden im Wasserbad gekocht und dann durch mehrmaligen Pufferwechsel äquilibriert. Die so erhaltene Gelsuspension wurde möglichst in einem Guß auf die Säulen gegeben, die Höhe des resultierenden Gelbettes lag meist bei ca. 30 cm. Der hydrostatische Druck wurde zwischen 20 und 20 cm Wassersäule eingestellt; so wurden die in der Firmenschrift angegebenen Durchflußraten erreicht. Die Säulenfüllungen wurden durch Spülen mit der 2 - 3fachen Volumenmenge Startpuffer stabilisiert und endgültig äquilibriert. Anschließend wurden mit Hilfe des Adapters die Proben aufgetragen, sodann mit einem Bettvolumen Startpuffer nachgewaschen, sodaß ungebundenes

Protein weggespült wurde. Dann wurde ein linearer Kochsalzgradient von 0,07 M - 0,17 M NaCl angelegt, dessen Volumen ca. das 5fache des Bettvolumens betrug. Das Fraktionsvolumen betrug bei der größeren Säule 10 ml, bei der kleineren Säule 5 ml. Die genauen Werte für Bett-, Proben-, Gradientenvolumina und Durchflußraten finden sich im Ergebnisteil, da sie in den einzelnen Versuchen etwas variieren. In jedem zweiten Röhrchen wurde mit dem Zeiss-Spektralphotometer die Extinktion bei 280 nm gemessen. Ebenso wurde in größeren oder engeren Abständen die DHT-Bindungsaktivität ermittelt. Gelegentlich wurde zur Kontrolle des Salzgradienten die NaCl-Konzentration in den Fraktionen gemessen (volumetrisch nach Mohr).

2.6. Gelchromatographie

2.6.1. Theoretische Vorbemerkungen

Proteine und andere Stoffe höheren Molekulargewichts lassen sich durch sogenannte Molekülsiebe ihrer Größe nach auftrennen. Bei den hier verwendeten Sephadex-Gelen handelt es sich um kleine Kugeln aus quervernetzten Dextranen. Beim Quellen in wäßrigen Lösungen entsteht ein Gel, dessen Porengröße von dem Grad der Vernetzung der Polysacchridketten abhängt. Die Moleküle eines gelösten Stoffes können je nach Größe mehr oder weniger gut in die Poren des Gels diffundieren. Den größeren Molekülen steht ein kleineres Volumen zur Verfügung als den kleineren; sie erscheinen daher nach Durchfluß eines geringeren Puffervolumens im Eluat.

Zur Beschreibung dieser Erscheinung definierte man zunächst verschiedene "Verteilungskoeffizienten":

$$K_d = (V_e - V_a) / V_i \qquad \text{GELOTTE (1960)}$$

$$K_{av} = (V_e - V_a) / (V_t - V_a) \qquad \text{LAURENT et al. (1964)}$$

V_e = Elutionsvolumen der Substanz, deren K-Wert bestimmt werden soll.

V_a = Ausschlußvolumen (Volumen außerhalb der Gelperlen)
V_i = inneres Volumen, Volumen der flüssigen Phase innerhalb der Gelperlen
V_t = Gesamtvolumen des Gelbettes

Die Verteilungskoeffizienten sind Stoffkonstanten, d. h. unabhängig von Säulendimensionen, Durchflußrate und Lösungsmittel.
Spätere Ansätze versuchten nun, die experimentell gemessenen K-Werte mit der Größe der Moleküle zu verknüpfen. Als "Größe" ist hierbei, wie sich zeigte, weniger das Molekulargewicht als der effektive hydrodynamische Radius, der Stokes-Radius, wirksam.
So übernahmen LAURENT et al. (1964) eine von OGSTON (1958) stammende Beziehung:

$$K_{av} = \exp.^{-L(R+a)^2}$$

L = Konzentration der Gelketten
a = Radius der als zylindrisch betrachteten Gelketten
R = Stokes-Radius
Da die Autoren die K_{av}-Werte für einige Proteine angeben und damit eine Vergleichsmöglichkeit gegeben war, wurde dieser Ansatz für die Abschätzung des Stokes-Radius benutzt.
Trägt man nun ausgehend von obiger Gleichung $(-\lg K_{av})^{1/2}$ einer Reihe von Proteinen mit bekanntem Stokes-Radius gegen diesen Radius auf, sollte man eine Gerade erhalten, was für eine ganze Reihe globulärer Proteine auch zutrifft. Aus dem gemessenen K_{av}-Wert eines unbekannten Proteins läßt sich also über eine Eichkurve sein Stokes-Radius ablesen. Haben das zu untersuchende Protein und die Vergleichsproteine ähnliche Form und ähnliche partielle Molvolumina, so läßt sich das Molekulargewicht auch direkt aus dem Elutionsvolumen abschätzen. Hierzu trägt man V_e gegen log MG auf und erhält so eine Eichgrade. Die mit einem solchen Plot ermittelten Molekulargewichte haben einen Fehler von bis

zu 20 % (WINZER 1969); sie lassen sich aber auch in Proteingemischen ermitteln, wenn ein spezifischer Test für das zu untersuchende Protein verfügbar ist (WHITAKER 1963, ANDREWS 1964, ANDREWS 1965).

2.6.2. Praktische Durchführung der Gelchromatographie

2.6.2.1. Durchführung der präparativen Gelchromatographie

Materialien: 0,05 M Tris-HCl-Puffer; pH 7,4; 0,005 M $CaCl_2$;
0,17 M NaCl (Endpuffer der Ionenaustauschchromatographie)
Sephadex S-200 superfine

Geräte: Säule K 16/70 (Fa. Pharmacia)
Fraktionssammler Ultrorac (Fa. LKB)
UV-Durchflußphotometer Uvicord (Fa. LKB)
Spektralphotometer PMQ II (Fa. Zeiss)

Da Sephadex S-200 in vorgequollenem Zustand geliefert wird, wurde lediglich durch Abgießen des Überstandes und Resuspension in Tris-Puffer ein Pufferwechsel vorgenommen. Nach 2 Tagen, in denen der Puffer noch mehrmals erneuert wurde, wurde die Gelsuspension in einem Guß auf die Säule gegeben, sodaß ein Gelbett 1,6 x 56 cm entstand. Zur Stabilisierung wurde noch mindestens 2 Stunden mit Puffer gespült. Die Probevolumen betrugen maximal 5 % des Bettvolumens und wurden mittels Adapter auf die Säule aufgetragen. Das Fraktionsvolumen betrug 1,5 ml. In jedem 2. Röhrchen wurde mit dem Zeiss-Spektralphotometer die Extinktion bei 280 nm gemessen. Außerdem wurde im engeren oder weiteren Abständen die DHT-BA ermittelt.

2.6.2.2. Durchführung der analytischen Gelchromatographie

Materialien: Myoblobin vom Pferd, reinst (Fa.Serva)
Ovalbumin aus Hühnerei, reinst (" ")
Hämoglobin vom Rind, reinst (" ")
Malatdehydrogenase vom Schwein, reinst (" ")
Katalase aus Rinderleber, reinst (" ")

Rinder-Serumalbumin (Fa. Behring)
Human-Transferrin (" ")

Geräte und sonstige Materialien wie unter 2.6.2.1. beschrieben.

Die unter 2.6.2.1. beschriebene Säule wurde zur Bestimmung des K_{av}-Werts und zur Abschätzung des Molekulargewichts geeicht. Die Homogenität der Säulenpackung wurde durch Chromatographie von 0,5 ml 0,1 %igem Dextranblau überprüft, gleichzeitig wurde das Ausschlußvolumen der Säule (= Elutionsvolumen von Dextranblau, MG 2 x 10^6) zu 48 ml bestimmt. Von den angeführten Eichproteinen wurden 1,5 ml einer 0,5 %igen Lösung aufgetragen und einzeln chromatographiert. Das Fraktionsvolumen betrug 1,5 ml. Die Elution wurde durch Messung der Extinktion bei 280 nm verfolgt. Als Elutionsvolumen wurde das Volumen genommen, nach dessen Durchfluß der Proteinpeak sein Maximum erreichte, abzüglich 1,5 ml für das Auftragsvolumen.
So wurden folgende K_{av}-Werte ermittelt:

Protein	K_{av}	$(-\lg K_{av})^{1/2}$	Stokes-R.
Ovalbumin	0,37	0,657	27,3 Å
Hämoglobin	0,34	0,685	31,3 Å
Rinder-Serumalbumin	0,28	0,743	35,0 Å
Transferrin	0,23	0,799	40,2 Å
Katalase	0,13	0,941	52,0 Å

Die Stokes-Radii wurden der Arbeit von LAURENT et al. (1964) entnommen. Für die Eichkurve wurde $\sqrt{(-\log K_{av})}$ gegen den Stokes-Radius aufgetragen.
Durch Auftragen von V_e gegen log MG wurde eine Eichkurve für das Molekulargewicht erstellt. Hierfür wurden zusätzlich Myoglobin und Malatdehydrogenase eingesetzt.
Die Eichdiagramme finden sich im Ergebnisteil.

2.7. Affinitätschromatographie

2.7.1. Theoretische Vorbemerkungen

Die Affinitätschromatographie gehört wie die Ionenaustauschchromatographie zur Gruppe der Adsorptionschromatographien. Hierbei macht man sich die oft sehr hohe und spezifische Affinität natürlich vorkommender Substanzen zu ihren ebenfalls natürlichen Substraten zunutze. Auf diese Weise kann man z.B. Antikörper mit Hilfe ihrer Antigene, Hormonrezeptoren mit Hilfe von Hormonen, Enzyme mittels ihrer Substrate isolieren. Das Säulenmaterial besteht dann aus einer unlöslichen Matrix (Sepharose 4B) und einem für das jeweilige Trennproblem geeigneten Liganden, der die zu isolierende Substanz aus der Lösung absorbiert. Die Desorption findet nach dem Fortwaschen aller ungebundenen Substanzen durch geeigneten Milieuwechsel statt.

Von Human-SHBG ist bekannt, daß es ein Glykoprotein ist(VAN BAELEN et al. 1969). Unter der Voraussetzung, daß dies auch für Kaninchen-SHBG zutrifft, erschien es gerade zur Abtrennung von Albumin sinnvoll, die Glykoproteinnatur des SHBG als Trennparameter einzusetzen.

Hierzu bietet sich Con A-Sepharose, die aus kovalent an Sepharose 4B gebundenem Concanavalin A besteht, an. Concanavalin A ist ein Metalloprotein, das spezifisch mit Zuckern, Polysacchariden und Glykoproteinen reagiert.

2.7.2. Praktische Durchführung der Affinitätschromatographie auf Con A-Sepharose

Materialien: Con A-Sepharose (Fa. Pharmacia)

Spülpuffer: 0,05 M Tris-HCl-Puffer; pH 7,4; 0,005 M $CaCl_2$; 0,17 M NaCl; 0,001 M $MnCl_2$ (Endpuffer der Ionenaustauschchromatographie + 0,001 M $MnCl_2$ (0,198 g $MnCl_2$ x 4 H_2O / 1))

Elutionspuffer: wie Spülpuffer, mit Zusatz von 0,05 M alpha-methyl-D-glucoside (9,71 g/l)

Geräte: Säule K 16/40 (Fa. Pharmacia)
Fraktionssammler Ultrorac (Fa. LKB)
UV-Durchflußphotometer Uvicord (Fa. LKB)
Spektralphotometer PMQ II (Fa. Zeiss)

Da Con A-Sepharose in vorgequollenem Zustand in Acetatpuffer geliefert wird, das Tris-HCl-Puffersystem aber beibehalten werden sollte, wurde durch Abgießen des Überstandes und Resuspension in Tris-Puffer ein Pufferwechsel vorgenommen. Dem Puffer wurde 0,001 M $MnCl_2$ zugesetzt, da Mn^{++}-Ionen für die Stabilität des Concanavalin A unbedingt erforderlich sind. Nach mehrfachem Pufferwechsel wurde die Gelsuspension in einem Guß auf die Säule gegeben, sodaß ein Gelbett von 1,6 x 3o cm entstand. Zur Stabilisierung wurde mit mehreren Bettvolumen Spülpuffer gespült. Anschließend wurden mittels Adapter die Proben aufgetragen, dann wurde so lange gespült, bis sich im Photometerstreifen zeigte, daß alles ungebundene Protein weggespült worden war. Schließlich wurde mit dem glykosidhaltigen Elutionspuffer eluiert. Das Fraktionsvolumen betrug 2 ml. In jedem 2. Röhrchen wurde mit dem Zeiss-Spektralphotometer die Extinktion bei 280 nm gemessen, desgleichen in größeren oder engeren Abständen die DHT-Bindungsaktivität.

2.8. Isoelektrische Fokussierung

2.8.1. Theoretische Vorbemerkungen

Isoelektrische Fokussierung ist ein Trennverfahren, bei dem amphotere Substanzen, vor allem Proteine und Peptide, in einem stabilen pH-Gradienten aufgrund von Unterschieden ihrer isoelektrischen Punkte getrennt werden. Der isoelektrische Punkt ist für jede amphotere Substanz eine charakteristische Größe.

Wenn der pH < pI, nimmt die amphotere Substanz durch Elektronenaufnahme eine negative Ladung an und wandert im elektrischen Feld zur Anode; bei pH > pI werden Protonen aufge-

nommen, die Substanz erhält eine positive Ladung und wandert zur Kathode. Besteht nun ein linearer pH-Gradient zwischen Anode und Kathode, so wandern die amphoteren Substanzen unabhängig davon, in welchem Teil des Gradienten sie sich zu Beginn der Trennung befinden, zu dem Punkt, der ihrem isoelektrischen Punkt entspricht (pH = pI). Ein einmal ausgebildetes Trennmuster bleibt bestehen, da die Fokussierung der Diffusion entgegenwirkt.

Nach dem Gesetz der pH-Monotonie darf in einem natürlichen pH-Gradienten kein Vakuum auftreten, d. h. um zwei Substanzen voneinander zu trennen, muß der Zwischenraum von anderen amphoteren Substanzen eingenommen werden. Hierzu dienen die von WESTERBERG (1966) entwickelten Trägerampholyte, das sind Polyaminocarbonsäuren, deren pIs dem gewünschten Ph-Bereich entsprechen und die im elektrischen Feld den pH-Gradienten selbständig ausbilden.

Es gibt mehrere Techniken der isoelektrischen Fokussierung, die sich in der Art, den pH-Gradienten gegen Konvektion zu stabilisieren, unterscheiden:

1) Fokussierung im Dichtegradienten (Saccharose, Athylglykol)
2) Fokussierung in kontinuierlichen Polyacrylamidgelen in einer etwa der Diselektrophorese entsprechenden Anordnung
3) Fokussierung in granulierten Gelen (Sephadex, Bio-Gel)

2.8.2. Praktische Durchführung der isoelektrischen Fokussierung in granulierten Gelen

Materialien: Sephadex G 75 superfine (Fa. Pharmacia)
Servalyt 2-11 (Fa. Serva)
Servalyt 2-6 (Fa. Serva)
Proteinmischung 8 (Fa. Serva)
Abklatschpapier ca. 120 g/m^2 (Fa. Desaga)
10 % Trichloressigsäure
Färbelösung: 0,2 % Coomassie Brillant Blue G 250 in Methanol/Wasser/Eisessig 50 : 50 : 10 v/v/v

Entfärbelösung: Methanol/H_2O/Eisessig
33 : 66 : 10 v/v/v

Geräte: Elektrophoresekammer (Fa. Desaga)
Netzgerät 0 - 1200 V (Fa. Desaga)
Pt-Breitbandelektroden (Fa. Desaga)
Glasplatten 20 x 20 cm
Plattenstreichgerät
pH-Meter

2.8.2.1. Durchführung der analytischen isoelektrischen Fokussierung

Hierbei wurde nach der Beschreibung von RADOLA (1973) und der Bedienungsanleitung für die Desaga DE-Doppelkammer vorgegangen.

Etwa 7,5 g Sephadex G 75 superfine läßt man über Nacht in 100 ml H_2O und 5 ml Servalyt (2 %) quellen, am nächsten Tag wird je nach Konsistenz noch etwas Wasser dazugegeben und die Suspension im Exsikkator entgast. Auf eine 20 x 20 cm große Platte werden mit Hilfe des Streichgerätes ca. 30 ml der Suspension verteilt. Die Platte läßt man dann mehrfach aus ca. 5 cm Höhe auf den Tisch fallen, damit eine völlig ebene, glänzende Oberfläche entsteht. Sobald die Oberfläche nicht mehr glänzt, kann man das Trocknen mit einem Föhn beschleunigen, bis am Rand der Platte ca. 3 mm lange Risse entstehen. Anschließend werden 10 - 20 ul der Vergleichslösung (Proteinmischung 8) und ca. 40 - 50 ul der Probenlösung 3 cm voneinander entfernt 5 cm von der Anode weg aufgetragen. Proteinmischung 8 besteht aus den 8 Proteinen Ferritin, Rinderalbumin, ß-lactoglobulin, Conalbumin, Myoglobin vom Pferd, Myoglobin vom Wal, Ribonuclease und Cytochrom C, deren isoelektrische Punkte im Bereich von 4,4 bis 10,65 liegen. Zum Teil sind diese Proteine schon von sich aus farbig, sodaß man mit ihrer Hilfe den groben Verlauf der Fokussierung direkt verfolgen kann. Die fertige Platte wird in die Kammer

gelegt, die Platin-Breitbandelektroden werden auf die Plattenränder aufgelegt und mit dem Gerät verbunden. Dann wird 4 Stunden bei 200 V und 2 - 3 Stunden bei 400 - 800 V fokussiert.

Auswertung: Nach Abschalten der Spannung wird ein 20 x 20 cm großer Bogen Abklatschpapier auf die Gelschicht gerollt, 1 Minute dort belassen, dann vorsichtig abgezogen und 15 Minuten bei 110°C im Trockenschrank getrocknet. Der getrocknete Abklatsch wird dreimal 30 Minuten lang in 10 %iger Trichloressigsäure gewaschen, um die Trägerampholyte zu entfernen, die sich sonst auch anfärben würden. Reste von Trichloressigsäure werden danach durch kurzes Spülen mit Entfärbelösung entfernt. Anschließend wird ca. 10 Minuten gefärbt und dann mit mehreren Chargen Entfärbelösung so lange entfärbt, bis der Hintergrund wieder weiß ist. Das restliche Gel auf der Platte wird zur Bestimmung des pH-Gradienten und der DHT-Bindungsaktivität in ca. 6 mm breiten Streifen abgekratzt. Von jedem Streifen wird ein Teil in 200 ul H_2O, ein Teil in 1 ml Endpuffer der Ionenaustauschchromatographie suspendiert. In der Suspension in Wasser wird der pH gemessen, vom Überstand der Puffersuspension werden 100 ul zur Bestimmung der DHT-Bindungsaktivität entnommen.

2.8.2.2. Durchführung der präparativen isoelektrischen Fokussierung

Die präparative Trennung erfolgt im Prinzip genauso wie die analytische. Folgende Faktoren wurden etwas verändert:

- Die Gelmenge pro Platte wird verdreifacht, wodurch sich die Trockenzeit wesentlich verlängert.
- Die Probenmenge beträgt bis zu 3 ml. Die Substanzlösung wird bei einem solchen Volumen mit dem trockenen Gel und den Trägerampholyten in entsprechendem Verhältnis vermischt. Auf der Platte wird je nach Menge ein entsprechend

breiter Graben ausgehoben und mit der Suspension ausgegossen.
- Der Abklatsch wird nur mit zwei je zwei cm breiten Abklatschpapierstreifen hergestellt.

2.9. Analytische Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgel

2.9.1. Theoretische Vorbemerkungen

Die sogenannte Disk-Elektrophorese wurde zum ersten Mal von ORNSTEIN (1964) beschrieben. Sie unterscheidet sich von der herkömmlichen Trägerelektrophorese vor allem in folgenden Punkten:
- Das Trägermaterial ist Polyacrylamidgel.
- Das Gel besteht aus 2 Abschnitten, dem großporigen Sammelgel und dem engporigen Trenngel.
- Die pH-Werte in Sammel- und Trenngel unterscheiden sich um fast 2 Einheiten.
- Der Laufpuffer hat eine andere ionale Zusammensetzung als der Gelpuffer.

Der Sinn dieser Anordnung ist folgender:

a) Die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen im Trenngel hängt von dessen Porengröße ab. Die Wanderung wird umso stärker behindert, je enger die Poren und je größer die Moleküle sind. Bezeichnet man mit m die elektrophoretische Beweglichkeit v/E der Partikel und mit m_o die "freie" elektrophoretische Beweglichkeit (die auf eine Gelkonzentration 0 extrapolierte Beweglichkeit), so wird der Zusammenhang zwischen der Beweglichkeit m und der Gelkonzentration durch die Gleichung

$$\lg m = \log m_o - KT \quad (T = \text{Gelkonz. in } \%)$$

gegeben.(ORNSTEIN 1964, FERGUSON 1964, HEDRICK et al. 1968). Zwischen der Konstanten K und dem Molekulargewicht der Beweglichkeiten bei verschiedenen Gelkonzentrationen läßt sich z. B. über einen sogenannten Ferguson-Plot das Molekulargewicht ermitteln. Eine Übersicht hierzu gibt MAURER (1971).

b) Vor dem Eintritt in das Trenngel wird das Protein im Sammelgel fokussiert; durch geeignete Auswahl der verschiedenen Puffer wird die Probe zwischen 2 Ionenfronten zusammengepreßt. Hierbei gilt die Kohlrauschsche Regulationsfunktion, eine Stabilitätsbedingung wandernder Ionenfronten.
Beim Übertritt ins Trenngel ändern sich der pH und damit die vom Dissoziationsgrad abhängigen effektiven Beweglichkeiten der Pufferionen. Die Probenbande wird von der hinteren Ionenfront überholt und wandert nun hinter den beiden Ionenfronten in einem Bereich mit konstantem Feldstärkegradienten. Die Trennung der Komponenten erfolgt also jetzt nach Ladung und Größe.
Im Vergleich zur herkömmlichen Trägerelektrophorese wird also erreicht, daß die Probe vor der Trennung in eine scharfe Ausgangszone konzentriert und neben der Ladung auch die Molekülgröße zur Trennung ausgenutzt wird.
Für das jeweilige Trennproblem hat man die Auswahl zwischen Gelsystemen eines großen Konzentrationsbereiches und zwischen einer ganzen Reihe von Puffersystemen mit verschiedenem Arbeits-pH.

2.9.2. Praktische Durchführung

Da im Rahmen dieser Arbeit Serumproteine aufgetrennt werden sollten, wurde folgendes von MAURER (1971) empfohlene System benutzt: Gelkonzentration 7,5 %; Konzentration bei pH 8,3; Trennung bei pH 9,5.

Materialien:

Vorratslösung I: 48,0 ml 1n HCl; 36,6 g Tris; 0,23 ml TEMED; H_2O ad 100 ml

Vorratslösung II: 30,0 g Acrylamid; 0,8 g Bisacrylamid; H_2O ad 100 ml

Vorratslösung III: 0,14 g Ammoniumpersulfat; H_2O ad 100 ml

Vorratslösung IV: 25,6 ml 1 M Phosphorsäure ; 5,7 g Tris; 0,46 ml TEMED; H_2O ad 100 ml

Vorratslösung V: 10,0 g Acrylamid; 2,5 g Bisacrylamid; H_2O ad 100 ml

Vorratslösung VI: 4 mg Riboflavin; H_2O ad 100 ml
Vorratslösung VII: 40,0 g Saccharose; H_2O ad 100 ml
Laufpuffer: 2,88 g Glycin; 0,06 g Tris; H_2O ad 1000 ml
(Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan, TEMED = N,N,N,N-tetramethyldiamin)
Zusammensetzung der Gele:

Trenngel: 1p I, 2p II, 1p H_2O, 4p III

Sammelgel: 1p IV, 2p V, 1p VI, 4p VII

Geräte:
Präzisionsglasröhrchen für die Diskelektrophorese
Ständer zur Aufbewahrung der Röhrchen während der Gelpolymerisation
Gummihütchen passen zu den Röhrchen (alle Geräte: Fa. Quickfit)
UV-Lampe (Teil der Quickfit PAGE-Apparatur)
Tuberkulinspritzen mit Kanülen, Pasteurpipetten

In die Gummihütchen werden je 0,2 ml Saccharoselösung (Lösung VII) pipettiert und dann die Glasröhrchen so hineingedreht, daß sich keine Luftblasen fangen. Die Röhrchen werden in den Ständer eingesetzt und die Saccharoselösung mit Hilfe einer Tuberkulinspritze vorsichtig mit 0,15 ml Sammelgellösung überschichtet. Durch Überschichten mit ca. 0,1 ml H_2O mit einer weiteren Spritze wird eine ebene Sammelgeloberfläche geschaffen. Die somit vorbereiteten Sammelgele werden mit dem Ständer in die PAGE-Apparatur geschoben und eine Stunde photopolymerisiert. Anschließend wird das überstehende Wasser mit einer Pasteurpipette und Filterpapierstreifen entfernt, die Röhrchen werden zweimal mit frisch bereiteter Trenngellösung gespült und dann bis zum oberen Rand mit Trenngellösung aufgefüllt. Nun wird wiederum mit etwas H_2O überschichtet, um eine ebene Geloberfläche zu schaffen und um Luftsauerstoff, der die Polymerisation behindert, fernzuhalten. Anschließend werden die Röhrchen eine Stunde zur chemischen Polymerisation (Radikalbildner ist das Ammoniumperoxodisulfat) stehengelassen.

Aufbringen der Probelösung:
MAURER (1971) empfiehlt die Inkorporierung der Probe in ein weitporiges Gel, um thermische Strömungen zu vermindern und das Vermischen mit dem Laufpuffer beim Hantieren mit den Röhrchen zu verhindern.
Die Lösung des Probengels wurde so angesetzt, daß zwischen 25 und 100 ug Protein in 100 ul aufgetragen wurden. Je nach Konzentration wurden folgende Mischungsverhältnisse gewählt:
I: 1p IV, 1p V, 1p VI, 4p VII, 1p Probe
II: 5p Probe, 100p Sammelgellösung
Zum Auftragen werden die Röhrchen herumgedreht und die Gummihütchen vorsichtig entfernt. Die Saccharoselösung wird abpipettiert, dann zweimal mit Sammelgellösung gespült und jeweils 0,1 ml Probegemisch aufgetragen. Nach Überschichten mit Laufpuffer wird 45 Minuten lang photopolymerisiert.
Durchführung der Trennung:
Gerät: Quickfit-PAGE-Apparatur
Diese Apparatur besteht im wesentlichen aus einer regelbaren, wahlweise strom- oder spannungsstabilisierten Stromquelle und den darüber befindlichen Elektrophoresegefäßen, bestehend aus Unterschale, Kühlschlangen und aufsetzbarem Oberteil. Das Oberteil besitzt Durchführungen für die Anode und die Gelröhrchen und nimmt Kathodenpuffer und Kathode auf.
Die untere Schale wird mit Laufpuffer gefüllt, dann wird das Kühlwasser angeschlossen. Die Gelröhrchen werden so in die Gummidichtungen des Oberteils gesteckt, daß sie noch etwa 1 cm in das Kathodengefäß reichen. Nun wird das Oberteil auf die Unterschale aufgesetzt, der Rest des Puffers wird mit 0,001 % Bromphenolblau versetzt und in die obere Schale gegossen, bis der Puffer ca. 1 cm über den oberen Enden der Gelröhrchen steht. Die Spannungsquelle wird angeschlossen und der Strom zunächst für 1 - 2 Minuten auf 1 mA pro Röhrchen eingestellt. Danach wird die Stromstärke möglichst kon-

stant auf 2 - 5 mA pro Röhrchen gehalten. Das Fortschreiten der Elektrophorese läßt sich am zugesetzten Bromphenolblau verfolgen, das mit der Ionenfront läuft und dort eine scharfe blaue Bande bildet. Bei den gewählten Bedingungen (Umgebungstemperatur 4°C) tritt diese Front nach ca. 1 Stunde in den Anodenpuffer. Etwa 10 Minuten später wird die Spannung abgeschaltet; zu dieser Zeit ist die Albuminbande noch etwa 5 mm vom unteren Gelende entfernt.

Anfärbung der Gele:

Die Färbung und Entfärbung der Gele wurde nach einer Vorschrift von KÖNIG et al. (197o) vorgenommen.

Färbelösung: 1p Coomassie Blue in H_2O (1 %) + 40p 6 %ige TCA in Essigsäure/Methanol/Wasser 7 : 20 : 80 v/v/v

Entfärbelösung: Essigsäure/Methanol/Wasser 20 : 120:280 v/v/v

Die Gele wurden mit Hilfe eines Tuberkulinspritzenstempels aus den Röhrchen herausgelöst und in ein Schliffgefäß mit 50 ml Färbelösung gegeben. Die Gele wurden in der Färbelösung über Nacht geschüttelt; danach wurde bis zur Entfärbung des Hintergrundes mit Entfärbelösung (mehrmaliger Wechsel) geschüttelt.

3. Verlauf und Ergebnisse der Arbeit

3.1. Ausgangsmaterial

Da zur Isolierung von Kaninchen-SHBG im Gegensatz zu Human-SHBG kein angereichertes Material zur Verfügung steht (z. B. Cohn-Fraktion IV, Placentarfraktion III), kam als Ausgangsmaterial nur einfaches Kaninchenserum in Frage. Dies wurde aus 3 - 4 kg schweren weiblichen Kaninchen selbst gewonnen.

3.2. Trennprozedur

Es sollte versucht werden, das von BLANK (1975) in unserem Labor entwickelte Verfahren für die Isolierung von Human-SHBG (2 x Ionenaustauschchromatographie + 2 x Gelchromatographie) in etwa auf das Kaninchen-SHBG zu übertragen, da es sicher das am wenigsten aufwendige der bisher beschriebenen Verfahren ist. Den starken Aktivitätsverlust von 98 %, den der Untersucher erhielt, hofften wir durch die konsequente Verwendung eines calziumhaltigen Puffers in allen Trennschritten zu vermeiden, da ROSNER (1975) fand, daß Ca^{++}-Ionen für die Erhaltung des SHBG unbedingt erforderlich sind. Außerdem sollte versucht werden, ob nicht unter diesen Bedingungen eine Ammonsulfatfällung zur Vortrennung eingesetzt werden kann. Der Versuch, mit Human-SHBG eine Ammonsulfatfällung vorzunehmen, hatte immer zu einem Zerfall des SHBG in mehrere Fraktionen geführt (BLANK 1975, ROSNER 1969).
Die Versuche wurden also mit der folgenden Reihenfolge der Trennschritte begonnen:

1) Ammonsulfatfällung der Globuline
2) Überprüfung der Salzfällung durch Gelfiltration auf Sephadex S-200
3) Ionenaustauschchromatographie zur weiteren Trennung
4) Gelchromatographie zur Weiterreinigung bis zur diskelektrophoretischen Einheitlichkeit

Als Puffersystem wurde der kationische (wegen des Anionenaustau-

schers DEAE-Sephadex) Puffer Tris/HCl/NaCl mit einem Zusatz von $CaCl_2$ verwendet, da dieses System nur durch Variierung der Kochsalzkonzentration in allen erwähnten Trennschritten verwendbar ist.

3.3. Fraktionierung von 36 ml Kaninchenserum

3.3.1. Ammonsulfatfällung der Globuline

36 ml Kaninchenserum wurden unter Rühren tropfenweise mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt. Der Niederschlag wurde 30 Minuten bei 800g abzentrifugiert, im Startpuffer der Ionenaustauschchromatographie gelöst und 12 Stunden unter mehrmaligem Pufferwechsel gegen Startpuffer dialysiert.

3.3.2. Überprüfung der Salzfällung durch Gelfiltration auf Sephadex S-200 (Abb. 1 und 2)

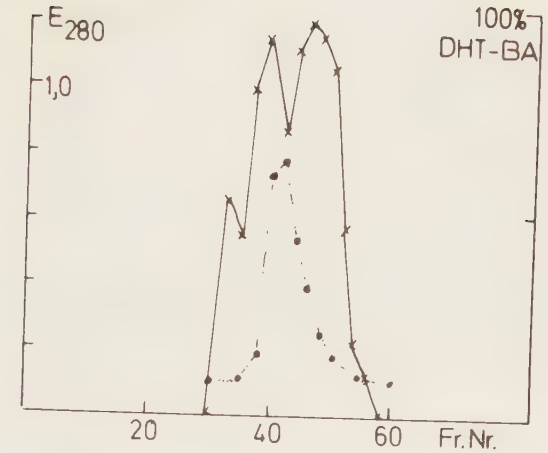
Je 1 ml Serum und 1 ml Dialysat wurden zum Vergleich auf eine mit Sephadex S-200 beschickte Säule gegeben.

Probevolumen: je 1 ml
Bettabmessung: 56 x 1,6 cm
Bettvolumen: 112,5 cm^3
Durchfluß: 3 ml/h
Fraktionsvolumen: 1,5 ml
Puffer: 0,05 M Tris/HCl; pH 7,4; 0,005 M $CaCl_2$; 0,17 M NaCl

Es fällt auf, daß im Dialysat im Gegensatz zum Serum eine wesentliche Abtrennung der Albumine erreicht wurde. Die DHT-Bindungsaktivität zeigt bei beiden Säulen nur je einen Peak; es hat also kein Zerfall in mehrere Fraktionen stattgefunden. Da die DHT-Bindungsaktivität im Peak beider Säulen bei 60 % lag, scheint auch kein wesentlicher Aktivitätsverlust eingetreten zu sein.

3.3.3. Auftrennung des Dialysats der Ammonsulfatfällung auf DEAE-Sephadex A 50 (Abb. 3)

Von den erhaltenen 48 ml Dialysat wurden 46 ml auf eine Säule



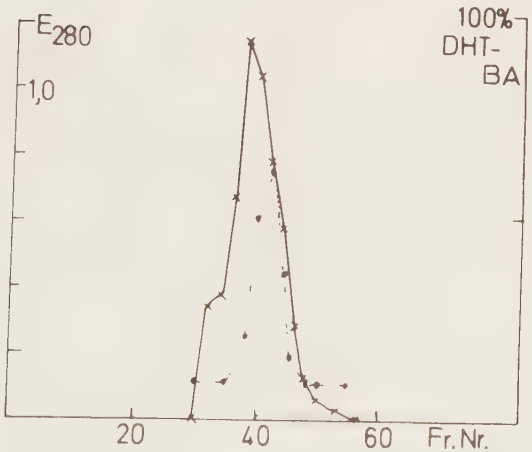


Abb. 1 (oben): Fraktionierung von 1 ml Kaninchenserum auf Sephadex S-200

Abb. 2 (unten): Chromatographie von 1 ml Dialysat der Ammonsulfatfällung auf Sephadex S-200

Die Bettabmessung betrug bei beiden Säulen 1,6 x 56 cm, das Fraktionsvolumen 1,5 ml. Eluiert wurde mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,4 mit Zusatz von 0,005 M $CaCl_2$ und 0,17 M NaCl.

Durchgezogene Linie: Proteinkonzentration
Punktierte Linie: DHT-Bindungsaktivität

mit DEAE-Sephadex A 50 gegeben.

Probevolumen: 46 ml

Bettabmessung: 2,6 x 25 cm

Bettvolumen: 133 cm^3

Durchfluß: 10 ml/h

Fraktionsvolumen: 5 ml

Startpuffer: 0,05 M Tris/HCl; pH 7,4; 0,005 M $CaCl_2$; 0,05 M NaCl

Endpuffer: ebenso, jedoch 0,2 M NaCl

Die Fraktionen 99-117 wurden gepoolt, konnten jedoch leider nicht weiter aufgearbeitet werden, da sie einem Laborunfall zum Opfer fielen.

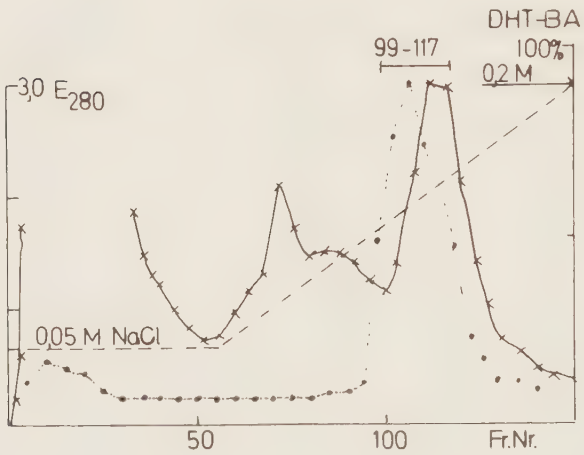


Abb. 3: Auftrennung des Dialysats der Ammonsulfatfällung auf DEAE-Sephadex A 50 (2,6 x 25 cm). Fraktionsvolumen 5 ml. Elution mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,4 mit Zusatz von 0,005M $CaCl_2$, Kochsalzgradient von 0,05 - 0,2 M NaCl.

3.3.4. Tabelle: Übersicht über die bisherige Fraktionierung

Prozedur	Vol. (ml)	Prot. (mg/ml)	Prot. (mg)	SHBG (ug/ml)	SHBG (ug)	SA x 10^{-3}	Pur.	Ausbeute
Serum	36	68,4	2462	6,62	238,3	0,096		
Ammonsulfatfällung, Dialyse								
Dialysat	48	21,3	1022	4,31	208,3	0,203	2,11	87,6%
Ionenaustausch-chromatographie								
Fr. 99-117	88	2,28	201	2,06	182,1	0,905	9,43	76,7%

3.3.5. Zusammenfassung und Diskussion der bisherigen Ergebnisse

Es zeigt sich, daß unter Verwendung eines calziumhaltigen Puffers eine Ammonsulfatfällung mit Erfolg durchgeführt werden kann. Sie ergibt eine gute Ausbeute an SHBG (87,6%), der Gesamtproteingehalt der Probe wird auf ca. die Hälfte reduziert. Die anschließende Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Se-

phadex A 50 ergibt ebenfalls eine gute Ausbeute (76,7%) an wiederum 4fach gereinigtem Protein.
Da sich das eingesetzte Verfahren bisher als erfolgreich erwies, wurde beschlossen, die Fraktionierung mit einer größeren Menge Serum zu wiederholen.

3.4..Fraktionierung von 257 ml Kaninchenserum

3.4.1. Ammonsulfatfällung der Globuline

257 ml Kaninchenserum wurden unter Rühren bei 4°C mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, der Niederschlag wiederum 3o Minuten bei 800g abzentrifugiert, im Startpuffer der Ionenaustauschchromatographie gelöst und 24 Stunden gegen mehrere Chargen Startpuffer dialysiert.

3.4.2. Auftrennung des Dialysats der Ammonsulfatfällung auf DEAE-Sephadex A 50 (Abb. 4)

Von den erhaltenen 195 ml Dialysat wurden 193 ml auf eine Säule mit DEAE-Sephadex A 50 gegeben.
Da die Chloridkonzentration im DHT-Peak der vorhergehenden Ionenaustauschchromatographie (3.3.3.) 0,15 M betrug, was einer NaCl-Konzentration von ca. 0,1 M entspricht, wurde der Kochsalzgradient zur besseren Auflösung etwas enger gefaßt und von da an so beibehalten.
Probevolumen: 193 ml
Bettabmessung: 5 x 25 cm
Bettvolumen: 490 cm^3
Durchfluß: 30 ml/h
Fraktionsvolumen: 10 ml
Startpuffer: 0,05 M Tris/HCl; pH 7,4; 0,005 M $CaCl_2$; 0,07 M NaCl
Endpuffer: ebenso, jedoch 0,17 M NaCl

Es zeigte sich im Prinzip der gleiche Elutionsverlauf wie in Trennung 3.3.3. (Abb. 3). Dieser Trennschritt scheint also

gut reproduzierbar zu sein.
Die Fraktionen 143-174 wurden gepoolt (Pool A1) und wiederum gegen mehrere Chargen Startpuffer dialysiert.

3.4.3. Rechromatographie des Pools A1 (Fraktion 143-174) auf DEAE-Sephadex A 50 (Abb. 5)

Von den in der Dialyse erhaltenen 317 ml von Pool A1 wurden 315 ml auf eine kleinere Säule aufgetragen und unter den gleichen Bedingungen wie im ersten Lauf eluiert.
Probevolumen: 315 ml
Bettabmessung: 2,5 x 25 cm
Durchfluß: 10 ml/h
Bettvolumen: 133 cm^3
Fraktionsvolumen: 5 ml
Start--und Endpuffer wie in 3.4.2.

Proteine und DHT-BA erscheinen nun in einem Peak, wobei der DHT-BA-Peak leicht vor den Proteinpeak verschoben ist.
Fraktion 129-159 werden gepoolt (Pool A2), die erhaltenen 132 ml gegen mehrere Chargen Endpuffer dialysiert und durch osmotischen Wasserentzug auf 10 ml (Pool A2k) konzentriert.
Nun soll die Reinigung gelchromatographisch weitergeführt werden.

3.4.4. Chromatographie des Pools A2k (Fraktion 129-159) auf Sephadex S-200 sf (Abb. 6)

Von den durch Konzentration erhaltenen 10 ml des Pools A2k wurden 5 ml auf eine Säule mit Sephadex S-200 sf gegeben.
Probevolumen: 5 ml
Bettabmessung: 1,6 x 57 cm
Bettvolumen: 115 cm^3
Durchfluß: 5 ml/h
Fraktionsvolumen: 1,5 ml
Puffer: Endpuffer der Ionenaustauschchromatographie

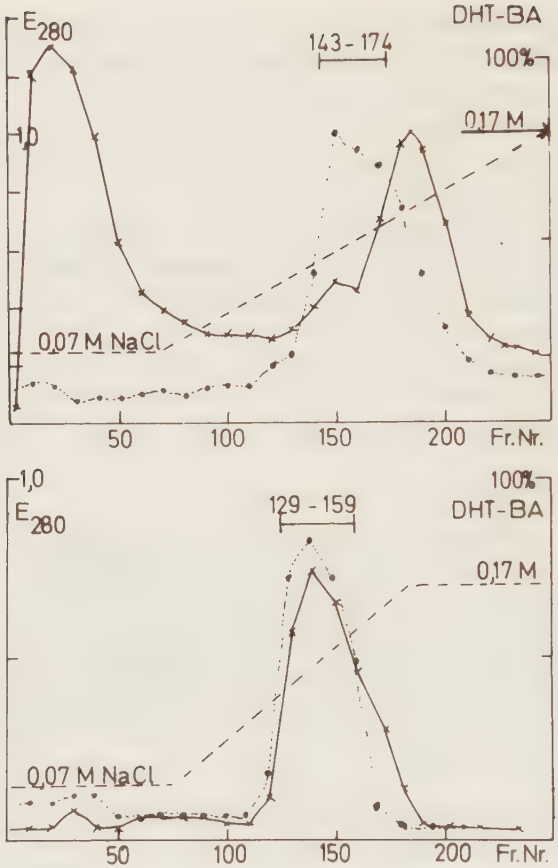


Abb. 4: (oben) Auftrennung des Dialysats der Ammonsulfatfällung auf DEAE-Sephadex A 50 (5 x 25 cm). Fraktionsvolumen 10 ml.

Abb. 5: (unten) Rechromatographie von Pool A1 auf DEAE-Sephadex A 50 (2,5 x 25 cm). Fraktionsvolumen 5 ml.

Elution bei beiden Säulen mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,4 mit Zusatz von 0,005 M $CaCl_2$, Kochsalzgradient von 0,07 - 0,17 M NaCl.

Der DHT-Peak erscheint im ansteigenden Schenkel des Proteinpeaks. Es sieht bereits so aus, daß sich die beiden Peaks zu sehr überschneiden, als daß eine ausreichende Trennung erzielt werden könnte. Trotzdem werden Fraktion 28-36 nochmals gepoolt (Pool A3) und durch osmotischen Wasserentzug auf 3 ml konzentriert (Pool A3k), um erneut gelchromatographiert zu werden.

3.4.5. Rechromatographie von Pool A3k (Fraktion 28-36) auf Sephadex S-200 sf (Abb. 7)

Pool A3k wird im ganzen (3 ml) auf die Sephadex S-200-Säule gegeben.
Probevolumen: 3 ml
sonstige Daten wie in 3.4.4.

Es zeigt sich im Prinzip das gleiche Bild wie in Abb. 6. Dies spricht zwar für die gute Reproduzierbarkeit der Gelchromatographie, zeigt aber auch, daß man, um einen mit der Bindungsaktivität übereinstimmenden Proteinpeak zu erhalten, noch einige Male rechromatographieren müßte, was bei den ohnehin geringen Ausgangskonzentrationen des SHBG sinnlos erscheint. Zur Protein- und quantitativen SHBG-Bestimmung werden Fraktion 30-36 nochmals gepoolt (Pool A4).

3.4.6. Übersicht über die Trennprozedur

Von Pool A2 wurde nach der Konzentration nur die Hälfte weiterverarbeitet. In der Tabelle sind in Klammern die auf die Gesamtmenge umgerechneten Werte aufgeführt, um die Ausbeute abschätzen zu können.

Tabelle: Übersicht über die Trennungsprozedur

Prozedur	Vol. (ml)	Prot. (mg/ml)	Prot. (mg)	SHBG (ug/ml)	SHBG (ug)	SA x 10^{-3}	Pur.	Ausbeute
Serum	257	67,3	17630	7,52	1832	0,104		
Ammonsulfatfällung, Dialyse								
Dialysat	195	28,4	5530	7,72	1395	0,262	2,58	76,1%
Ionenaustauschchrom.								
Pool A1	317	3,7	1170	4,04	1280	1,095	10,52	69,8%
Ionenaustauschchrom.								
Pool A2	132	3,7	180	7,49	988	2,06	19,8	53,8%
Konzentration + Gelchromatographie								
Pool A3	12	2,6	31,2 (62,4)	15,50	186 (372)	5,96	57,2	20,3%
Konzentration + Gelchromatographie								
Pool A4	9,5	0,48	4,56 (9,02)	4,34	41,3 (82,6)	9,88	94,8	4,5%

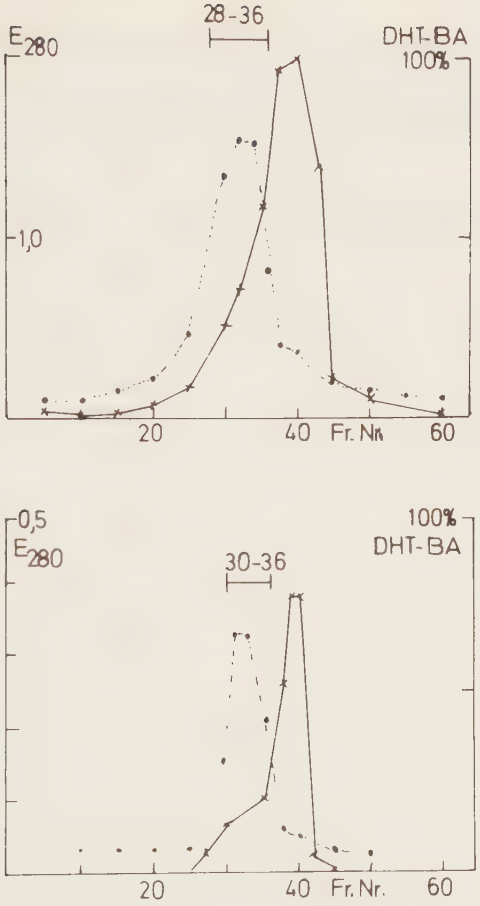


Abb. 6: Chromatographie von 5 ml Pool A2k auf Sephadex (oben) S-200.

Abb. 7: Rechromatographie von Pool A3k auf Sephadex (unten) S-200.

Bettabmessung bei beiden Säulen 1,6 x 57 cm. Fraktionsvolumen 1,5 ml. Elution mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,4 mit Zusatz von 0,005 M $CaCl_2$ und 0,17 M NaCl.

3.4.7. Diskussion der bisherigen Ergebnisse

Es hat sich wiederum gezeigt, daß bei Verwendung eines calziumhaltigen Puffers eine Ammonsulfatfällung mit gutem Erfolg zur Vortrennung eingesetzt werden kann. Auch die zweimalige Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sephadex A 50 hat einen guten Reinigungseffekt und ist ein sinnvoller Schritt zur weiteren Trennung. Die in dem Schema von BLANK (1975) anschließend eingesetzte zweimalige Gelfiltration zeigt bei der Isolierung von Kaninchen-SHBG jedoch nicht die gleichen Erfolge wie beim Human-SHBG. Proteinpeak und Peak der Bindungsaktivität überschneiden sich zu sehr, um eine ausreichende Trennung zuzulassen. Die zweimalige Konzentrierung bringt offensichtlich auch erhebliche Verluste an SHBG und Gesamtprotein. In dem zuletzt erhaltenen Pool A4 sind bei Umrechnung auf die Gesamtmenge noch ca. 0,1 mg SHBG bei einem Gesamtproteingehalt von 9 mg enthalten, sodaß auf eine weitere Aufarbeitung verzichtet wird. Bei diesen 9 mg kann es sich auch nicht um inaktives SHBG handeln, da

1) der Anfangsgehalt des Serums an SHBG bei 1,8 mg lag,
2) der calziumhaltige Puffer die Aktivität des SHBG doch offensichtlich zu erhalten scheint,
3) in der Disk-Elektrophorese von Pool A4 noch mehrere Banden sichtbar sind.

Es hat sich also gezeigt, daß von dem von BLANK (1975) in unserem Labor entwickelten Verfahren nur die Ionenaustauschchromatographie auf die Isolierung von Kaninchen-SHBG übertragen werden kann. Die unzureichenden Trennerfolge der Gelfiltration beruhen offensichtlich auf dem unterschiedlichen Molekulargewicht von Kaninchen-SHBG und Human-SHBG. DAs MG von Human-SHBG wird in den meisten Untersuchungen zwischen 95000 und 115000 angegeben (HANSSON 1972, CORVOL et al. 1971, BLANK 1975), das MG von Kaninchen-SHBG wurde von MAHOUDEAU et al. (1972) mittels Gelfiltration und Diskelektrophorese in Polyacrylamidgel zu 74000 bestimmt,

was sehr nahe beim Molekulargewicht von Albumin mit 69000 liegt.
Im folgenden sollte nun versucht werden, ob man die Glykoproteinnatur des SHBG dazu ausnützen könnte, durch eine Affinitätschromatographie auf ConA-Sepharose restliches Albumin und andere eventuell noch vorhandene Proteine ohne Glykosidgruppen abzutrennen. Dazu wurde die zweite Hälfte von Pool A2k verwendet.

3.4.8. Chromatographie von Pool A2k auf Con A-Sepharose (Abb. 8)

Die zweite Hälfte von Pool A2k wurde im ganzen auf die Con A-Säule gegeben.
Probevolumen: 5 ml
Bettabmessung: 1,6 x 30 cm
Bettvolumen: 60,3 cm^3
Durchfluß: 6 ml/h
Fraktionsvolumen: 2 ml
Spülpuffer: Endpuffer der Ionenaustauschchrom. + 0,001 M $MnCl_2$
Elutionspuffer: Spülpuffer + 0,05 M alpha-methyl-D-glucoside

Es zeigt sich das für eine solche Chromatographie typische Bild eines breiten Spülpeaks und eines scharfen Elutionspeaks. Die Bindungsaktivität erscheint ausschließlich in einem fast genau mit dem Elutionspeak übereinstimmendem Peak. Kaninchen-SHBG wird also von Concanavalin A gebunden, was ein Hinweis, wenn auch nicht ein Beweis dafür sein mag, daß Kaninchen-SHBG wie Human-SHBG ein Glykoprotein ist.
Fraktion 110-131 (Pool A3b) wurden gepoolt, zur Entfernung des Zuckers gegen mehrere Chargen Endpuffer der Ionenaustauschchromatographie dialysiert und durch osmotischen Wasserentzug auf 4 ml konzentriert (Pool A3bk). Es interessierte nun, wie sich dieser Pool bei einer Gelfiltration verhält.

3.4.9. Chromatographie von Pool A3bk auf Sephadex S-200 sf (Abb. 9)

Die 4 ml des Pools A3bk wurden unter den gleichen Bedingungen wie unter 3.4.4. beschrieben an Sephadex S-200 sf aufgetrennt. Es erscheint ein ähnliches Elutionsprofil wie in Abb. 6 und Abb. 7, d. h. DHT-Peak und Proteinpeak liegen zu nahe beieinander, um eine ausreichende Trennung zu ermöglichen. Fraktion 27-35 wurden gepoolt (Pool A4b).

Da uns in der vorhergehenden Affinitätschromatographie auf Con A-Sepharose (Abb. 8) der Spülpeak im Vergleich zum Elutionspeak sehr klein erschien, sollte nun noch einmal versucht werden, ob durch die Verwendung eines Puffers höherer Ionenstärke mehr eventuell unspezifisch adsorbiertes Protein weggewaschen werden könnte.

3.4.1o. Chromatographie von Pool A4b auf Con A-Sepharose (Abb. 1o)

Die erhaltenen 12 ml von Pool A4b wurden auf Con A-Sepharose aufgetragen.

Probevolumen: 12 ml

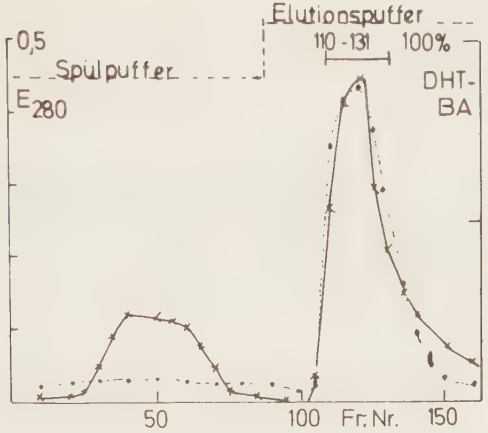
Spülpuffer: Endpuffer der Ionenaustauschchromatographie + 0,001 M $MnCl_2$, jedoch 1) 0,5 M NaCl
2) 1 M NaCl

sonstige Daten wie in 3.4.8.

Die Erhöhung der Ionenstärke zeigt allerdings keinen Erfolg; sämtliches Protein erscheint fest an Con A gebunden.

3.4.11. Diskussion der bisherigen Ergebnisse.

Es sieht so aus, daß Kaninchen-SHBG mit einfachen säulenchromatographischen Verfahren nicht isoliert werden kann. Der Einsatz von Con A-Sepharose bringt aufgrund dessen, daß der größte Teil des nach der Ionenaustauschchromatographie vorhandenen Proteins an Concanavalin bindet, nicht den gewünschten Erfolg.



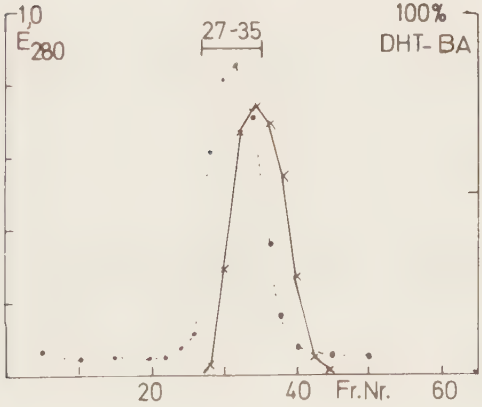


Abb. 8: (oben) Chromatographie von 5 ml von Pool A2k auf Con A-Sepharose (1,6 x 30 cm). Fraktionsvolumen 2 ml. Gespült wurde mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,4 mit Zusatz von 0,005 M $CaCl_2$, 0,17 M NaCl und 0,001 M $MnCl_2$. Der Elutionspuffer enthielt zusätzlich 0,05 M alpha-methyl-D-glucoside

Abb. 9: (unten) Chromatographie von Pool A3bk auf Sephdex S-200 (1,6 x 57 cm). Fraktionsvolumen 1,5 ml. Elution mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,4 mit Zusatz von 0,005 M $CaCl_2$ und 0,17 M NaCl.

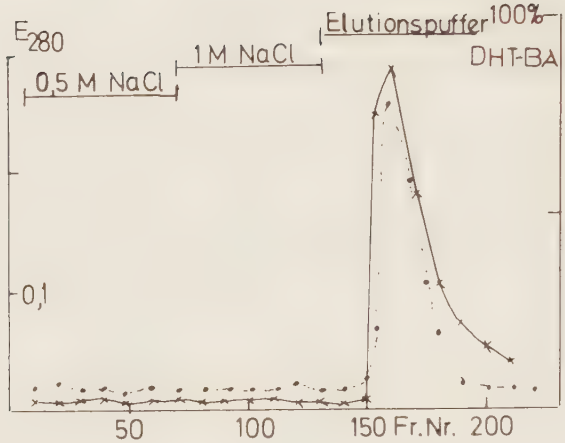


Abb. 10: Chromatographie von Pool A4b auf Con A-Sepharose (1,6 x 30 cm). Fraktionsvolumen 2 ml. Gespült wurde mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,4 mit Zusatz von 0,005 M $CaCl_2$, 0,001 M $MnCl_2$ und 1. 0,5 M NaCl, 2. 1 M NaCl. Der Elutionspuffer enthielt zusätzlich 0,05 M alpha-methyl-D-glucoside.

Eine Affinitätschromatographie mittels an Sepharose gekoppeltem DHT, wie sie von ROSNER et al. (1975) zur Isolierung von Human-SHBG eingesetzt wurde, erschien im Rahmen dieser Arbeit zu aufwendig und zu kostspielig.
Das weitere Vorgehen sah nun folgendermaßen aus:

1) Da die Hauptschwierigkeit nicht in der Abtrennung von Albumin zu liegen scheint, was wir anfangs aufgrund des von MAHOUDEAU et al. (1972) angegebenen Molekulargewichts von 74000 annahmen, sollten zunächst noch einmal mittels Gelfiltration MG und Stokes-Radius abgeschätzt werden.
2) Da inzwischen die Geräte für eine isoelektrische Fokussierung angeschafft worden waren, sollte zunächst der isoelektrische Punkt von Kaninchen-SHBG bestimmt und dann versucht werden, ob diese Methode nach der Ammonsulfatfällung und zweimaligen Ionenaustauschchromatographie präparativ eingesetzt werden kann.
3) Nach einigen Anfangsschwierigkeiten lief der Test zur quantitativen Bestimmung des SHBG nun reibungslos. Dies sollte nun benutzt werden, um die SHBG-Konzentrationen in denSeren männlicher und weiblicher Kaninchen vergleichend zu bestimmen.

3.5. Bestimmung von Molekulargewicht und Stokes-Radius von Kaninchen-SHBG (Abb. 11 + 12)

Zur Abschätzung des Molekulargewichts und des Stokes-Radius wurde die Sephadex S-200-Säule in der im Methodenteil beschriebenen Weise geeicht. Als Elutionsvolumen für SHBG wurde das Volumen angenommen, nach dessen Durchfluß der Peak der DHT-Bindungsaktivität sein Maximum erreichte, abzüglich 1,5 ml für das Auftragsvolumen. Obwohl man auf diese Weise das Molekulargewicht aus Serum bestimmen kann, wurden, da ein geringerer Proteingehalt der Probe die Genauigkeit der Gelfiltration erhöht, 1,5 ml von Pool A2 aufgetragen.
Das Molekulargewicht von Kaninchen-SHBG beträgt demnach etwa 89000, der Stokes-Radius ungefähr 38 Å.

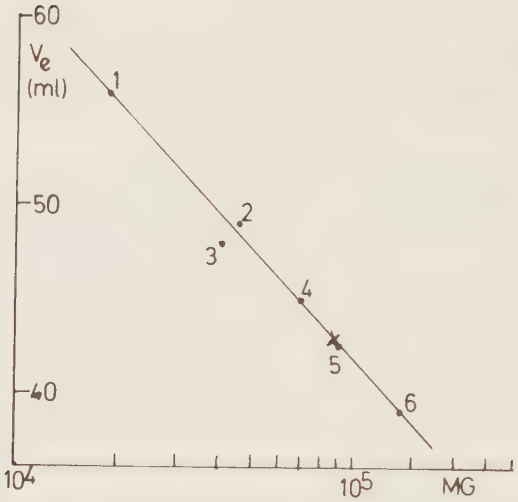


Abb.12

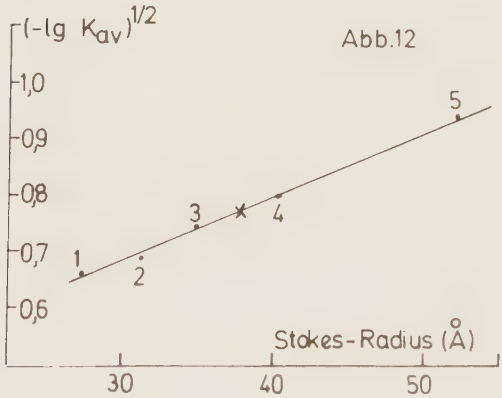


Abb. 11: (oben) Eichdiagramm zur Abschätzung des Molekulargewichts globulärer Proteine aus Gelfiltrationsdaten

1 Myoglobin
2 Ovalbumin
3 MDH
4 BSA
5 Transferrin
6 BSA-Dimer

Kreuz: SHBG

Abb. 12: (unten) Eichdiagramm zur Abschätzung des Stokes-Radius durch Gelfiltration

1 Ovalbumin
2 Hämoglobin
3 BSA
4 Transferrin
5 Katalase

Kreuz: SHBG

3.6. Fraktionierung von 264 ml Kaninchenserum

Es sollte nun untersucht werden, ob nach Ammonsulfatfällung und zweimaliger Ionenaustauschchromatographie eine isoelektrische Fokussierung zur weiteren Trennung eingesetzt werden kann.

3.6.1. Vorfraktionierung

Ammonsulfatfällung und zweimalige Ionenaustauschchromatographie wurden mit 264 ml Kaninchenserum wie unter 3.4.1. bis 3.4.3. beschrieben durchgeführt. Im Verlauf zeigten sich keine wesentlichen Abweichungen.

Nach der zweiten Ionenaustauschchromatographie erhielten wir einen Pool von 2o6 ml (Pool B2) mit einem Proteingehalt von 2,7 mg/ml und einer SHBG-Konzentration von 7,31 ug/ml. Diese 2o6 ml von Pool B2 wurden durch osmotischen Wasserentzug auf 9,5 ml konzentriert.

3.6.2. Analytische isoelektrische Fokussierung von Pool B2 (Abb. 13 + 14)

Zunächst einmal soll der isoelektrische Punkt von Kaninchen-SHBG bestimmt werden.

Dazu werden 1o ul der Vergleichslösung und 2o ul von Pool B2 auf eine analytische Platte mit dem pH-Bereich 2-11 aufgetragen. Nach Beendigung der Fokussierung wird ein Abklatsch angefertigt, das restliche Gel in 28 gleich breiten Streifen abgekratzt und teils in Puffer, teils in Wasser suspendiert. In diesen Suspensionen werden pH und DHT-BA bestimmt (Abb.13). Bei der Abfärbung zeigt es sich, daß das gesamte Protein in zwei Bereichen fokussiert wird; der eine Bereich liegt ungefähr zwischen pH 4 und 5, der andere etwa bei pH 7. Eine nennenswerte DHT-Bindungsaktivität zeigt sich jedoch nur im Bereich von pH 4-5.

Um die Auflösung zu verbessern, wird die Trennung nun in ein-

geengtem pH-Bereich wiederholt. Hierzu wird der Bereich pH 4-6 gewählt (Abb. 14).
Der isoelektrische Punkt von Kaninchen-SHBG liegt demnach bei pH 4,6, also sehr nahe bei dem von Albumin von 4,7. Beim Vergleich mit der Anfärbung zeigt es sich, daß das Maximum der DHT-Bindungsaktivität direkt unter einer starken Albuminbande liegt.

3.6.3. Präparative isoelektrische Fokussierung von Pool B2k (Abb. 15)

Die Trennung im pH-Bereich 4-6 wurde nun mit 3 ml von Pool B2k wiederholt.
Entsprechend der größeren Gelmenge wird jeder Gelstreifen in 5 ml Puffer suspendiert und im Überstand die DHT-Bindungsaktivität bestimmt (Abb. 15). Es fällt auf, daß die DHT-BA auch im präparativen Maßstab 4o % nicht übersteigt. Fraktion 8-12 wurden gepoolt und mit mehreren Chargen Puffer eluiert (Pool B3).
Es erschien nun sinnvoll, zur Abtrennung noch vorhandenen Albumins den Pool noch einmal auf Con A-Sepharose zu geben. Dies hat auch den Vorteil, daß im gleichen Arbeitsgang die Trägerampholyte entfernt werden, da sie nicht an Concanavalin A gebunden werden.

3.6.4. Chromatographie von Pool B3 auf Con A-Sepharose (Abb. 16)

Die durch mehrmalige Elution erhaltenen 6o ml von Pool B3 wurden auf eine Säule mit Con A-Sepharose aufgetragen.
Probevolumen: 6o ml
sonstige Daten wie in 3.4.8.

Es wird nun leider offensichtlich, daß der größte Teil des SHBG bei der isoelektrischen Fokussierung zerstört wurde. Im Glykoproteinpeak zeigt sich zwar noch eine gewisse Bin-

dungsaktivität, diese steigt jedoch nicht mehr über 3o %. Fraktion 17o-19o werden zur Bestimmung von SHBG und Proteingehalt gepoolt (Pool B4).

3.6.5. Übersicht über die Fraktionierung

Prozedur	Vol. (ml)	Prot. (mg/ml)	Prot. (mg)	SHBG (ug/ml)	SHBG (ug)
Serum	264	66,6	17510	8,36	2190
Ammonsulfatfällung + 2 x Ionenaustauschchromatogr.					
Pool B2	206	2,7	556	7,31	1502
Konzentration + isoelektrische Fok. + Affinitätschrom.					
Pool B4 (1/3 von Pool B2)	39	0,34	13,26	nicht mehr signifikant vom Leerwert zu unterscheiden	

Mit dem Rest von Pool B2k wurde noch mehrmals versucht, durch Variation von Spannung und Laufzeit bessere Ergebnisse zu erzielen, jedoch ohne Erfolg.

3.6.6. Zusammenfassung und Diskussion der bisherigen Ergebnisse

Der isoelektrische Punkt von Kaninchen-SHBG wurde zu 4,6 bestimmt. Im präparativen Maßstab hat sich auch die isoelektrische Fokussierung als erfolglos erwiesen, Kaninchen-SHBG wurde weitgehend zerstört. Dies ist für eine ganze Reihe von Proteinen bekannt und liegt einmal in den möglicherweise zu hohen Temperaturen, die trotz Kühlung bei der Fokussierung in der Elektrophoresekammer entstehen, zum anderen ist ja die Löslichkeit der Proteine gerade an ihrem isoelektrischen Punkt am geringsten, sodaß sie ausfallen und denaturieren. Variation von Laufzeit und Spannung brachten keine Verbesserungen.

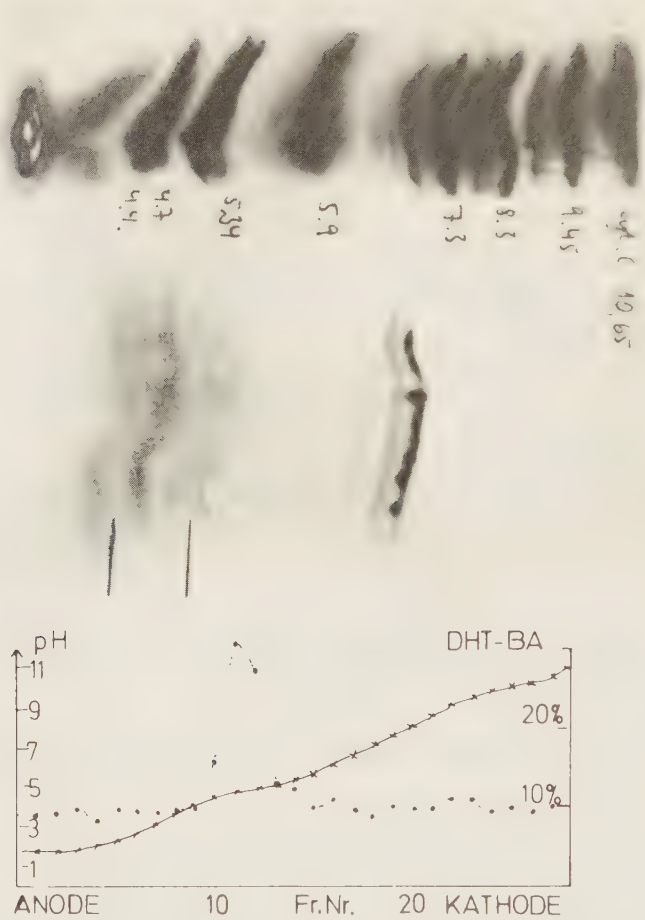


Abb. 13: Analytische isoelektrische Fokussierung von Pool B2 im Bereich pH 2 - 11.
oben: Anfärbung des Abklatschpapiers
unten: Verlauf von pH und DHT-BA in den 28 abgekratzten Fraktionen

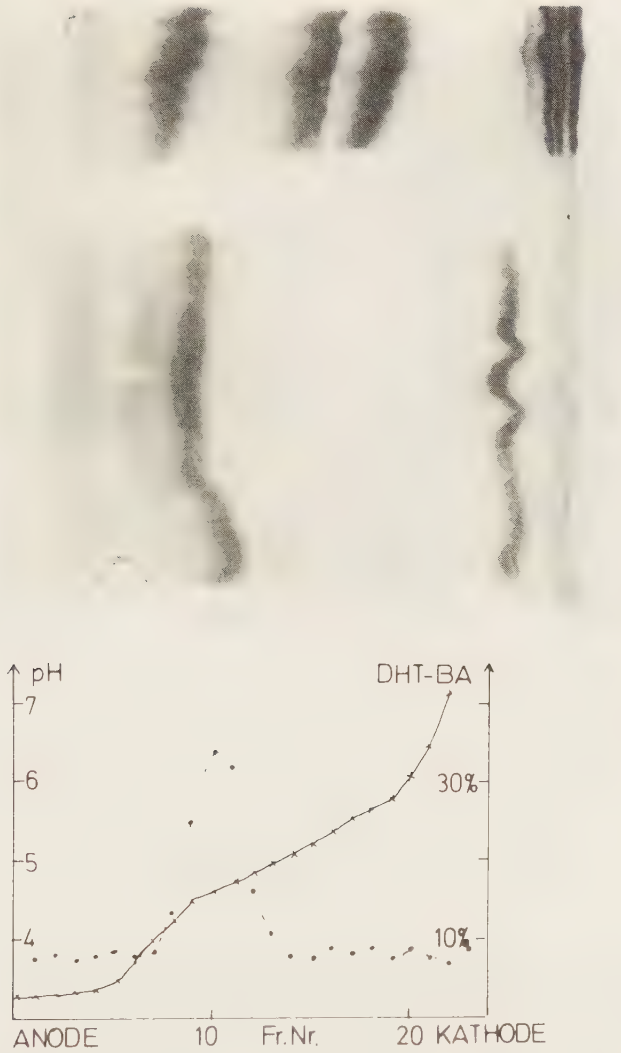
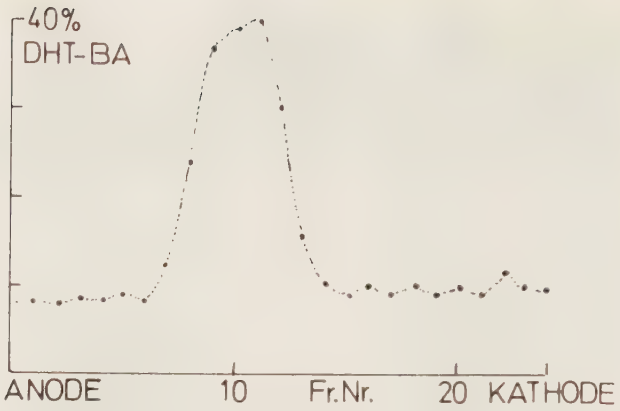


Abb. 14: Analytische isoelektrische Fokussierung von Pool B2 im Bereich pH 4 - 6.
oben: Anfärbung des Abklatschpapiers
unten: Verlauf von pH und DHT-BA inden 24 abgekratzten Fraktionen



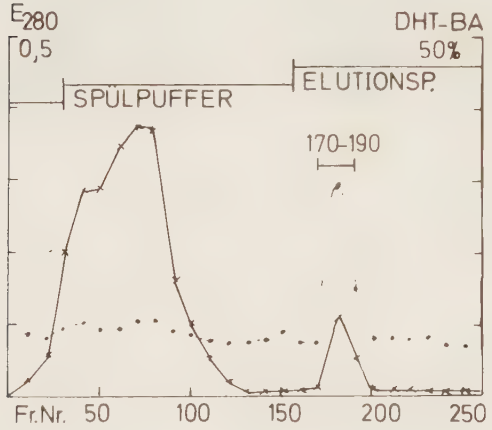


Abb. 15: (oben) Verlauf der DHT-Bindungsaktivität bei der präparativen isoelektrischen Fokussierung von Pool B2k im Bereich pH 4 - 6.

Abb. 16: (unten) Chromatographie von Pool B3 auf Con A-Sepharose (1,6 x 30 cm). Fraktionsvolumen 2 ml. Gespült wurde mit 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,4 mit Zusatz von 0,005 $CaCl_2$, 0,17 M NaCl und 0,001 M $MnCl_2$. Der Elutionspuffer enthielt zusätzlich 0,05 M Alpha-methyl-D-glucoside.

7.7. Bestimmung der SHBG-Konzentration in den Seren männlicher und weiblicher Kaninchen

Es wurden die Seren von 5 männlichen und 8 weiblichen Kaninchen untersucht. Bei einem weiblichen Kaninchen, dessen SHBG-wert durch seine Höhe aus dem Rahmen fiel, stellte sich später heraus, daß es schwanger gewesen war.
Es wurden folgende Werte erhalten (unter Verwendung des von uns ermittelten Molekulargewichts von 89000):

männliche K.	weibliche K.
1,81 mg/l	7,89 mg/l
2,58 mg/l	8,58 mg/l
1,98 mg/l	6,63 mg/l
3,43 mg/l	7,62 mg/l
2,73 mg/l	7,38 mg/l
	10,33 mg/l
	9,29 mg/l
	17,64 mg/l (schwanger)

Der Mittelwert betrug für die männlichen Kaninchen 2,50 mg/l mit einer Standardabweichung von 0,64 mg/l, für die nicht schwangeren weiblichen Kaninchen betrug er 8,24 mg/l bei einer Standardabweichung von 1,23 mg/l.

4. Diskussion

4.1. Versuche zur Isolierung von Kaninchen-SHBG

Als Ausgangspunkt für die hier beschriebenen Versuche diente die Arbeit von BLANK (1975). Die von dem Autor entwickelte Methode zur Isolierung von Human-SHBG verwendet die "klassischen" säulenchromatographischen Methoden der Ionenaustauschchromatographie und der Gelchromatographie und ist sicher das am wenigsten aufwendige der bisher beschriebenen Verfahren.
Vom Kaninchen steht nun leider kein vorfraktioniertes Material (z.B. Cohn-Fraktion IV, Placentarfraktion III), wie es von allen Autoren zur Isolierung von Human-SHBG verwndet wird (MERCIER-BODARD et al. 1971, BOHN 1974, BLANK 1975, ROSNER 1975), zur Verfügung, sodaß bei der Isolierung von Serum und somit recht geringen Anfangskonzentrationen an SHBG ausgegangen werden muß. Diesen Nachteil konnten wir durch den erfolgreichen Einsatz einer Ammonsulfatfällung zur Vortrennung ausgleichen, entgegen den Erfahrungen anderer Autoren, bei denen der Versuch, mit Human-SHBG eine Ammonsulfatfällung durchzuführen, stets zu einem starken Aktivitätsverlust des SHBG und zu einem Zerfall in mehrere Fraktionen geführt hatte (ROSNER 1969, BLANK 1975). Hierbei, wie auch bei allen anderen Trennschritten, ist die Verwendung des von ROSNER (1975) für die Erhaltung des SHBG als unbedingt notwendig beschriebenen calziumhaltigen Puffers von entscheidender Bedeutung. Die Ammonsulfatfällung lieferte mit 87,6% bzw. 76,1% (s. Tabelle 3.3.4. und 3.4.6.) gute Ausbeuten an SHBG und reduzierte den Proteingehalt der Probe auf ca. die Hälfte, sodaß ihr Einsatz bei künftigen SHBG-Präparationen jeglicher Spezies emphehlenswert erscheint.
Nach erfolgreich durchgeführter Ammonsulfatfällung

wurden die Versuche in der von BLANK (1975) für die Isolierung von Human-SHBG beschriebenen Weise (2 x Ionenaustauschchromatographie + 2 x Gelchromatographie) fortgeführt. Der Vergleich der Ergebnisse dieses Autors mit unseren entsprechenden Elutionsdiagrammen und Tabelle 3.4.6. zeigt folgendes: Die erste Ionenaustauschchromatographie verläuft bezüglich Elutionsverhalten und Ausbeuten bei Mensch und Kaninchen nahezu identisch; sie bringt in beiden Fällen gute Ausbeuten (ca. 90% der eingesetzten SHBG-Menge) an etwa 4fach gereinigtem Protein. Der Reinigungseffekt der zweiten Ionenaustauschchromatographie ist bei uns hingegen wesentlich geringer; der Gesamtproteingehalt wird nur auf noch einmal die Hälfte reduziert gegenüber einer Reduktion auf ein Zehntel bei Human-SHBG. Allerdings wird hier die segensreiche Wirkung des calziumhaltigen Puffers deutlich sichtbar, da bei uns die Ausbeute an aktivem SHBG nach Ammonsulfatfällung und zweimaliger Ionenaustauschchromatographie noch bei 53,8% liegt, was dem tatsächlichen SHBG-Gehalt entsprechen dürfte, während in den Untersuchungen von BLANK (1975) die Ausbeute an aktivem SHBG nur noch 9,6% beträgt, was der Autor im wesentlichen auf einen Verlust an Aktivität und nicht auf einen tatsächlichen Proteinverlust zurückführt.

Unzureichend sind beim Kaninchen auf jeden Fall die Ergebnisse der zweimaligen Gelchromatographie. Während beim Menschen der DHT-Peak gut abtrennbar zwischen zwei Proteinpeaks liegt, überschneiden sich beim Kaninchen DHT-Peak und Proteinpeak zu sehr, um eine ausreichende Trennung zuzulassen; der Gesamtproteingehalt läßt sich nur auf Kosten des SHBG-Gehaltes reduzieren, die spezifische Aktivität der Probe an

SHBG wird nicht genügend erhöht. Dies ist auf das noch später zu diskutierende unterschiedliche Molekulargewicht von Human-SHBG und Kaninchen-SHBG zurückzuführen. Es hat sich demnach gezeigt, daß mit den "einfachen" Methoden der Ionenaustauschchromatographie und Gelchromatographie Kaninchen-SHBG nicht isoliert werden kann.

Die erfolgversprechendste Methode wäre nun sicher der Einsatz einer Affinitätschromatographie mittels an Sepharose gekoppeltem DHT gewesen, wie sie von ROSNER (1975) zur Isolierung von Human-SHBG verwendet wurde. Dieses Verfahren erschien jedoch im Rahmen dieser Arbeit zu aufwendig und zu kostspielig, da die Säulenfüllung zunächst auf ziemlich komplizierte Weise hergestellt werden muß und dann die Säule nur einmal zu verwenden ist, weil aufgrund der hohen Affinität des SHBG zu DHT der Sepharose-DHT-SHBG-Komplex gespalten werden muß. Relativ "einfach" schien hingegen der Versuch, die Glykoproteinnatur des SHBG durch eine Affinitätschromatographie auf Con A-Sepharose als Trennparameter auszunutzen, zumal wir zunächst aufgrund des von MAHOUDEAU et al. (1973) angegebenen Molekulargewichts von 74000 die Hauptschwierigkeit in der Abtrennung von Albumin sahen. Con A-Sepharose wird in vorgefertigtem Zustand geliefert, ist gut regenerierbar und somit immer wieder verwendbar. Leider zeigt auch diese Methode keinen ausreichenden Erfolg. Sie hat zwar einen gewissen Trenneffekt, der ihren Einsatz, eventuell in künftigen Präparationen anstelle der wenig gewinnbringenden zweiten Ionenaustauschchromatographie, rechtfertigt, jedoch bindet ein sehr großer Teil des vorhandenen Proteins an Concanavalin A (Abb. 8), sodaß man, wie die nachfolgende Gelfiltration zeigt (Abb. 9), nach der Affinitätschromatogra-

phie auf Con A-Sepharose wieder vor den gleichen Problemen steht wie nach der zweimaligen Ionenaustauschchromatographie. DHT-Peak und Proteinpeak überschneiden sich bei der Gelfiltration immer noch zu sehr, um eine ausreichende Trennung zuzulassen.
Hiermit schienen nun die gängigen säulenchromatographischen Methoden ausgeschöpft und somit die Grenzen dieser Arbeit erreicht. Da jedoch mittlerweile die Geräte für eine isoelektrische Fokussierung angeschafft worden waren, wollten wir diese Gelegenheit nicht ungenutzt verstreichen lassen und versuchen, ob diese auch von ROSNER (1975) zur Isolierung von Human-SHBG verwendete Methode nach Ammonsulfatfällung und zweimaliger Ionenaustauschchromatographie in präparativem Maßstab zur Trennung eingesetzt werden kann. Es zeigt sich jedoch, daß die isoelektrische Fokussierung zu einer Zerstörung der Aktivität des SHBG führt, die DHT-BA steigt nicht mehr über 30 %, die quantitative SHBG-Bestimmung erbringt nicht mehr signifikant vom Leerwert zu unterscheidende Konzentrationen. Die Ursache dieses Aktivitätsverlustes liegt möglicherweise bei den schon unter 3.6.6. aufgeführten Gründen, d.h. den trotz Kühlung bei der Fokussierung entstehenden zu hohen Temperaturen oder der geringen Löslichkeit und Denaturierung des Proteins bei Erreichen des isoelektrischen Punkts. Auch ist es bei der Fokussierung in granulierten Gelen auf Platten nicht möglich, das für die Erhaltung des SHBG notwendige Puffermilieu beizubehalten, im Gegensatz zu der von ROSNER (1975) verwendeten Methode der Fokussierung im Dichtegradienten in einer Säule.

4.2. Physikalisch-chemische Eigenschaften von Kaninchen-SHBG

Das Molekulargewicht von Kaninchen-SHBG wurde von MAHOUDEAU et al. (1973) mittels Gelfiltration und Polyacrylamidgelelektrophorese auf 74000 geschätzt. Da die so ermittelten Molekulargewichte einen Fehler von bis zu 20% haben (WINZER 1969), liegt der von uns bei der Gelfiltration erhaltene Wert von 89000 noch in etwa im gleichen Bereich. Betrachtet man zusätzlich den von LEA (1973) für das Molekulargewicht von Meerschweinchen-SHBG ermittelteten Wert von 82800, so erhält man eine Gruppe von Werten um 80000. Für Ratten-SHBG liegen bisher leider keine Ergebnisse vor. Auf jeden Fall besteht ein deutlicher Unterschied zum Molekulargewicht von Human-SHBG, das auf Werte zwischen 95000 und 115000 geschätzt wurde (VAN BAELEN et al. 1968, ROSNER et al. 1969, CORVOL et al. 1971, HANSSON et al. 1972, BLANK 1975), und dem SHBG von Makakenaffen, das GAUTHIER-WRIGHT et al. (1973) zu 105000 bestimmten.
Der von uns zu 38 Å bestimmte Stokes-Radius von Kaninchen-SHBG unterscheidet sich ebenfalls deutlich von dem von Human-SHBG mit 46 Å (HANSSON et al. 1972, BLANK 1975). Allerdings ermittelte LEA (1973) für Meerschweinchen-SHBG mit 49 Å einen Wert, der den des Human-SHBG noch übersteigt. Man muß sich jedoch fragen, wie er gleichzeitig ein relativ geringes Molekulargewicht von 82800 und einen so großen Stokes-Radius erhalten konnte.
Human-SHBG besitzt nach Untersuchungen von HANSSON et al. (1972) mehrere isoelektrische Punkte zwischen 5,2 und 5,5, der isoelektrische Punkt von Makakenaffen-SHBG wurde von GAUTHIER-WRIGHT et al. (1973) zu 5,41 bestimmt. Wir erhielten für Kaninchen-SHBG einen I.P. von 4,6, allerdings auf relativ ungenaue Weise, da

wir mangels Mikroelektrode das abgekratzte Gel in Wasser suspendierten und dann den pH maßen. LEA (1973) ermittelte für Meerschweinchen-SHBG zwei isoelektrische Punkte von 3,5 und 4,4.

Tabelle: Übersicht über die physikalisch-chemischen Eigenschaften des SHBG verschiedener Arten

	Molekulargewicht	Stokes-Radius	isoelektr. Punkt
Kaninchen-SHBG	89000 (eigene Untersuchungen) 74000 (MAHOUDEAU et al. 1973)	38 Å	4,6
Meerschweinchen-SHBG	82800 (LEA 1973)	49 Å	3,5 und 4,4
Makakenaffen-SHBG	105000 (GAUTHIER-WRIGHT et al.1973)		5,41
Human-SHBG	95000-115000 (Untersucher s. Text)	46 Å	5,2 - 5,5

Läßt man den mit 49 Å etwas zu hoch erscheinenden Wert für den Stokes-Radius von Meerschweinchen-SHBG beiseite, so scheinen sich Kaninchen-SHBG und Meerschweinchen-SHBG doch zu ähneln in Bezug auf ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, während ein deutlicher Unterschied zum Human-SHBG und dem SHBG von Makakenaffen besteht, die sich beinahe identisch verhalten. Man könnte hier also zumindest die Existenz zweier verschiedener SHBG-Moleküle postulieren, wobei das SHBG-Molekül von Primaten größer ist und im elektrischen Feld im weniger Sauren fokussiert als das SHBG-Molekül anderer Säugetiere. Dies mag für das biologische Verhalten unerheblich sein, zeigt aber, daß z.B. die Probleme bei der Isolierung verschieden sein können.

4.3. Quantitative SHBG-Bestimmungen bei männlichen und weiblichen Kaninchen

Nach unseren Bestimmungen liegen die SHBG-Konzentrationen von weiblichen Kaninchen mit durchschnittlich 8,24 mg/l etwa dreimal so hoch wie die von männlichen Kaninchen mit ca. 2,50 mg/l. Zwar sind damit sowohl die Absolutwerte höher als beim Menschen, die beim erwachsenen Mann ca. 2 mg/l, bei der Frau ungefähr 4 mg/l betragen (BLANK et al. 1978, ATTANASIO et al.), als auch die Geschlechtsdifferenz, aber gerade der analog dem Menschen hohe Wert bei einem schwangeren Kaninchen zeigt,daß doch ein ähnliches biologisches Verhalten vorliegt. Aufgrund dieser Verhältnisse dürfte das Kaninchen auf jeden Fall ein geeignetes Modell für weitere Untersuchungen sein.

5. Zusammenfassung

Es wurde versucht, das von BLANK (1975) für die Isolierung von Human-SHBG entwickelte Verfahren (2 x Ionenaustauschchromatographie + 2 x Gelchromatographie) auf Kaninchen-SHBG zu übertragen unter dem zusätzlichen Einsatz einer Ammonsulfatfällung zur Vortrennung. Ammonsulfatfällung und Ionenaustauschchromatographie zeigten gute Ergebnisse, die Gelfiltration erwies sich aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts von Human-SHBG und Kaninchen-SHBG als erfolglos. Auch die zusätzlich eingeführten Methoden der Affinitätschromatographie auf Con A-Sepharose und der isoelektrischen Fokussierung zeigten entweder ungenügenden Reinigungseffekt oder führten zur Zerstörung des SHBG.
Das Molekulargewicht von Kaninchen-SHBG wurde durch Gelfiltration auf 89000 abgeschätzt, der Stokes-Radius zu 38 Å bestimmt. Bei der isoelektrischen Fokussierung fand sich für Kaninchen-SHBG ein isoelektrischer Punkt bei pH 4,6.
Vergleichende quantitative SHBG-Bestimmungen erbrachten für weibliche Kaninchen etwa dreimal so hohe Konzentrationen wie für männliche Kaninchen.

6. Literaturverzeichnis

ALFSEN, A.: Etude de la liaison testosterone-serum albumine et l'action de l'heptane sur la molecule de serumalbumine.
C.R.Lab.Carlsberg 33, 415 (1963)

ANDERSON, D.C.: Sex-hormone-binding-globulin
Clin.Endocrin. (Oxf.) 3,69 - 96 (1974)

ANDERSON, D.C.,LASLEY, B.L., FISHER, R.A., SHEPARD, J.H., NEWMAN, L. and HENDRICKX, A.G.: Transplacental gradients of sex-hormone-binding-globulin in human and simian pregnancy.
Clin.Endocrin. (Oxf.) 5, 657 - 669 (1976)

ANDREWS, P.: Estimation of molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration.
Bioch.J. 91, 222- 233 (1964)

ANDREWS, P.: The gel filtration behaviour of proteins related to the molecular weight over a wide range.
Bioch.J. 96, 595 - 606 (1965)

ATTANASIO, A., EICHNER, M., BLANK, B. and GUPTA, D.: The development of endocrine function in human premature babies: A longitudinal study.
Communication in first international Congress of auxology, Rome, April 1977

ATTANASIO, A., BLANK, B., SCHEEL, H.-G., RAGER, K. and GUPTA, D.: SHBG-concentration in girls during puberty
(in Druck)

BAULIEU, E.E. and RAYNAUD, J.P.: A proportion graph method for measuring binding systems.
Eur.Bioch.J. 13, 293 - 304 (1970)

BLANK, B.: Isolierung und quantitative Bestimmung des menschlichen Sexualhormon-bindenden Globulins. Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der Universität Tübingen, Tübingen 1975

BLANK, B., ATTANASIO, A., RAGER, K. and GUPTA, D.: Determination of serum sex hormone binding globulin (SHBG) in preadolescent and adolescent boys. J.Steroid Biochem. 9, 121 - 125 (1978)

BOHN, H.: Isolierung, Charakterisierung und quantitative Bestimmung des steroidbindenden beta-Globulins. Blut 29, 17 - 31 (1974)

BURKE, C.W. and ANDERSON, D.C.: Sex-hormone-binding globulin is an oestrogen amplifier. Nature 240, 38 - 40 (1972)

CORVOL, P.L., CHRAMBACH, A., REDBORD, P. and BARDIN, C.W.: Physical properties and binding capacity of testosterone-estradiol-binding globulin in human plasma, determined by polyacrylamid gel electrophoresis J.Biol.Chem. 246, 3435 - 3443 (1971)

DE MOOR, P., HEYNS, W. and BOUILLON, K.: Growth hormon and the steroid binding beta-Globulin of human plasma. J.Steroid Biochem. 3,593 - 600 (1972)

EIK-NES, K., SCHELLMAN, J.A., LUMRY, R. and SAMUELS, L.T.: Binding of steroids to protein. First solubility determination. J.Biol.Chem. 206, 411 - 419 (1954)

FERGUSON, K.A.: Starch gel electrophoresis. Application to the classification of pituitary proteins and poly peptides. Metabolism 13, 985 - 1002 (1964)

GALVAO-TERES, A., ANDERSON, D.C., BURKE, C.W., MARSHALL, J.C., CORKER, C.S., BOWN, R.L. and CLARK,M.C.: Biologically active androgens and oestradiol in men with chronic liver disease.
Lancet 1, 173 - 177 (1973)

GAUTHIER-WRIGHT, F., BAUDOT, N. and MAUVAIS-JARVIS, P.: Testosterone-binding globulin in stump-tailed macaque monkeys.
Endocrinology 92, 1277 - 1286 (1973)

GELOTTE, B.: Studies on gel filtration. Sorption properties of the bed material sephadex.
J.Chromat. 3, 330 - 342 (1960)

GUPTA, D., RAGER, K., ATTANASIO, A., KLEMM, W. and EICHNER, M.: Sex steroid hormones during multiphase pubertal development.
J.Steroid Biochem. 6, 859 - 868 (1975)

HANSSON, V., LARSEN, J. and REUSCH, E.: Physikochemical properties of the 5-alpha-dihydrotestosterone-binding protein in human male serum.
Steroids 20, 555 - 574 (1972)

HEDRICK, J.L. and SMITH, A.J.: Size and charge separation and estimation of molecular weights by disc gel electrophoresis.
Arch.Bioch.Biophys. 126, 155 - 164 (1968)

KÖNIG,C., STEGEMANN, R. FRANCKSEN, H. and PAUL, L.H.: Protein subunits in the potato virus K-group
Bioch.Biophys.Acta 207, 184 - 189 (1970)

LAURENT, T. and KILLANDER, J.: A theory of gel filtration and its experimental verification.
J.Chromat. 14, 317 - 330 (1964)

LEA, O.A.: Isolation and characterisation of a progesterone- and testosterone-binding globulin from pregnant guinea pig serum.
Bioch.Biophys.Acta 317, 351 - 363 (1973)

MAHOUDEAU, J.A. and CORVOL, P.: Rabbit testosterone-binding globulin.
Endocrinology 92, 1113 - 1125 (1973)

MAURER, H.: Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamid gel electrophoresis.
Berlin, New York: De Gruyter 1971

MC CORMACK, S.: Plasma testosteron concentration and binding in the chimpanzee, effects of age.
Endocrinology 89, 1171 - 1177 (1971)

MERCIER, C., ALFSEN, A. and BAULIEU, E.E.: A testosterone binding globulin.
Proceedings of the Second Symposium on Steroid Hormones. Exc. Med. I.C.S. 101, 212 (1966)

MERCIER-BODARD, C., ALFSEN, A. and BAULIEU, E.E.: Sex steroid binding plasma protein.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 147, 204 - 224 (1970)

MURPHY, B.E.P.: Binding of testosterone and estradiol in plasma.
Canad.J.Biochem. 46, 299 - 302 (1968)

OGSTON, A.G.: The spaces in a random uniform suspension of fibers.
Trans.Far.Soc. 54, 1754 - 1757 (1968)

OLIVO, J., SOUTHREN, A.L., GORDON, G.C. and TOCIMOTO, S.: Studies of the protein binding of testosterone in plasma in disorders of the thyroid function: effect of therapy.
J.Clin.Endocrin. 31, 539 - 545 (1970)

ORNSTEIN, L.: Disc electrophoresis. Theory and basic Procedure.
Ann.N.Y.Acad.Sc. 121, 321 - 349 (1964)

RADOLA, B.J.: Isoelectric focussing in layers of granulated gels.
Bioch.Biophys.Acta 295, 412 - 428 (1973)

RAYNAUD, J.-P., MERCIER-BODARD, C. and BAULIEU, E.E.: Rat estradiol binding plasma protein (EBP).
Steroids 18, 767 - 788 (1971)

ROSENBAUM, W., CHRISTY, N.P. and KELLY, W.C.: Electrophoretic evidence for the presence of an estrogen-binding-beta-globulin in human plasma.
J.Clin.Endocr. 26, 1399 - 1403 (1966)

ROSENFIELD, R.L.: Plasma testosterone binding globulin and indexes of the concentration of unbound plasma androgen in normal and hirsute subjects.
J.Clin.Endocr. 32, 717 - 728 (1971)

ROSNER, W.: A simplified methoe for the quantitative determination of testosterone-estradiol-binding-globulin activity in human plasma.
J.Clin.Endocrin. 34, 983 - 988 (1972)

ROSNER, W. and DARMSTADT, R.A.: Demonstration and partial characterisation of a rabbit serum protein which binds testosterone and dihydrotestosterone.
Endocrinology 92, 1700 - 1707 (1973)

ROSNER, W. and SMITH, W.: Isolation of testosterone binding globulin.
Meth.Enzymol. 36, 109 - 120 (1975)

ROSNER, W., CHRISTY, N.P. and KELLY, W.G.: Partial purification and preliminary characterisation of estrogen-binding globulin from human plasma.
Biochemistry (Wash.) 8, 3100 - 3108 (1969)

TULCHINSKY, D. and CHOPRA, I.J.: Competitive ligand-binding assay for measurement of Sex-hormone-binding globulin (SHBG).
J.Clin.Endocrin. 37, 873 - 881 (1973)

VAN BAELEN, H., HEYNS, W. and DE MOOR, P.: Microheterogenity of the testosterone binding globulin of human pregnancy serum demonstrated by isoelectric focussing.
Ann.Endocr.(Paris) 30, 199 (1969)

VAN BAELEN, H., HEYNS, W., SCHONNE, E. and DE MOOR, P.: An estradiol binding globulin in human serum: partial purification.
Ann.Endocr.(Paris) 29, 153 - 158 (1968)

VERMEULEN, A. and VERDONCK, L.: Studies on the binding of testosterone to human plasma.
Steroids 11, 609 - 635 (1968)

VERMEULEN, A., VERDONCK, L., VAN DER STRAETEN, M. and ORIE, N.: Capacity of the testosterone-binding-globulin in human plasma and influenece of specific binding of testosterone to its metabolic clearance rate.
J.Clin.Endocr. 29, 1470 - 1480 (1969)

VESTERBERG, O. and SVENSSON, H.: Isoelectric fractionation, analysis and characterisation of ampholytes in natural pH-gradients.
Acta Chem.Scand. 20, 820 - 834 (1966)

WESTPHAL, U. and ASHLEY, B.D.: Steroid-protein interactions. VIII. Structure of delta-4-3-keto-steroids in relation to spectrophotometric interactions with human serum albumin.
J.Biol.Chem. 237, 2763 - 2768 (1962)

WHITAKER, J.R.: Determinationof molecular weights of proteins by gel filtration on sephadex. Anal.Chem. 35, 1950 - 1953 (1963)

WINZER, D.J. in LEACH, S.J. (Editor): Physical principles and techniques in macromolecular chemistry. Bd. A. New York, London: Academic Press 1971

Ich danke Prof.Dr.D.Gupta für die Überlassung des Themas und sein ständiges Interesse am Fortgang der Arbeit. Herrn Dipl.-Biochem. B.Blank danke ich für die Einführung in die Methodik und viele wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Lebenslauf

Am 2.5.1953 wurde ich, Sigrid Herold, als Tochter des Diplom-Kaufmanns Dr.Hans Herold und seiner Ehefrau, der Zahnärztin Dr.Ruth Herold geb. Brentrup in Dernbach/Unterwesterwaldkreis geboren.
Vom Frühjahr 1959 bis zum Frühjahr 1963 besuchte ich die Volksschule in Montabaur, anschließend das Staatliche Gymnasium Montabaur, wo ich am 17.5.1971 das Abitur am Neusprachlichen Zweig ablegte.
Im Wintersemester 1971/72 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Studium der Biochemie, im Wintersemester 1972/73 zusätzlich mit dem Studium der Humanmedizin. Den ersten Teil des Vordiploms in Biochemie legte ich im Frühjahr 1973, den zweiten Teil im Herbst 1975 in Tübingen ab. Im August 1974 bestand ich in Reutlingen die Ärztliche Vorprüfung, im März 1976 den ersten und im August 1977 den zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung. Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Juni 1976 bis September 1977 durchgeführt. Von Oktober 1977 bis September 1978 absolvierte ich das Praktische Jahr des Medizinstudiums am Bürgerhospital in Stuttgart. Den dritten Teil der Ärztlichen Prüfung legte ich am 18.10.1978 an der Universität Tübingen ab.